



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER

INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL
CÁNCER

(CSIC-USAL)

Función de C3G en la señalización plaquetaria utilizando modelos de ratón transgénicos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Sara Gutiérrez Herrero

Bajo la dirección de la Doctora

Carmen Guerrero Arroyo

Salamanca, 2018



Dra. **CARMEN GUERRERO ARROYO**, Profesora Titular del Departamento de Medicina, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC, CSIC-Universidad de Salamanca).

CERTIFICA:

Que Dña. **Sara Gutiérrez Herrero**, licenciada en Biología y Bioquímica por la Universidad de Salamanca, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “Función de C3G en la señalización plaquetaria utilizando modelos de ratón transgénicos”, y considera que éste reúne originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el Tribunal correspondiente y optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Salamanca 26 de Marzo de 2018



Fdo. Dra. Carmen Guerrero Arroyo

Directora de la Tesis

Sara Gutiérrez Herrero ha realizado esta tesis doctoral siendo beneficiaria de una ayuda predoctoral de la Universidad de Salamanca (Plan propio 2013) cofinanciada por el Banco Santander durante el periodo de Enero de 2014 a Mayo de 2018.

Este trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos del Plan nacional I+D+I: “*Análisis in vitro e in vivo de la función de C3G en diferentes tipos celulares y su impacto en patologías cardiovasculares y en metástasis*” (SAF2013-48210-C2-1R) y “*Función de C3G en el desarrollo tumoral y en la patofisiología del hígado. Implicación de C3G plaquetario en la angiogénesis y en enfermedades hepáticas y cardiovasculares*” (SAF2016-76588-C2-2-R) financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y de los proyectos del Programa de apoyo a proyectos de investigación de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León “*Estudio del papel de C3G y p38 MAPK en la función plaquetaria y desarrollo de neutrófilos: implicaciones en la regulación de la leucemia mieloide crónica*” (SA157A12-1) y “*Papel de C3G en la regulación de la función plaquetaria: Implicaciones en angiogénesis y aplicación al diagnóstico y tratamiento de la enfermedad trombótica*” (SA017U16).

A Iria, Ekaitz, mamá y Jose,
por el estímulo y el apoyo incondicional
en todo momento, y por ser ellos la
inspiración para finalizar este proyecto.

“Soy una persona tranquila,
la inquieta es mi mente”

Mario Benedetti

AGRADECIMIENTOS

Me considero una persona bastante reservada en cuanto a expresar mis sentimientos y más aún por medio de la escritura. Pero en esta ocasión, llegado este momento tan importante de mi vida, la presentación de esta tesis, no sólo debo sino que estoy entusiasmada de poder expresar mis agradecimientos a todas las personas que han participado en este trabajo y a las que han formado parte de mi vida en este periodo y que espero que sigan formando parte de ella.

En primer lugar, como no podía ser de otra manera, quiero agradecerle a mi directora de tesis, Dra. Carmen Guerrero Arroyo, por haber confiado en mí desde el primer momento y darme la oportunidad de trabajar a su lado. Por su esfuerzo y dedicación, por su interés, por aportarme tantos conocimientos, tantos consejos, por enseñarme a razonar e iluminar con sus ideas este trabajo cuando yo tantas veces me desesperaba intentando desentrañar tantas rutas de señalización. Sin ella este trabajo no habría sido posible. Y porque se, que aunque pase el tiempo seguirá el contacto. Muchas gracias por todo Carmen.

Gracias también a Chema. Imposible imaginar un laboratorio sin ti! Gracias por todas tus aportaciones, tus conocimientos, tus sugerencias. Gracias por tu ayuda en el laboratorio, en informática....

Gracias a todos mis compañeros y también amigos del Laboratorio 17. Gracias a Sara Ortiz, del grupo de las "Saras", por tantos momentos que hemos pasado codo a codo, viajes, tantas conversaciones, tantas veces que me has ayudado cuando lo he necesitado. Gracias a Víctor, por aportarme ideas y por esas conversaciones, a veces, demasiado trascendentales. Gracias a Arturo, siempre con una sonrisa, con su buen carácter y su predisposición a ayudar y a aportar ideas. Imposible olvidarme de JAM, con quien tan bien me entendía y al que tanto cariño que le tengo. Gracias a Sergio, del que voy a echar de menos, entre otras cosas su buena mano con la repostería con la que siempre nos deleitaba. Y gracias a las nuevas incorporaciones Luis, Cristina y Antonio y a los que ya no están, María, Ana...

Quiero dar las gracias también a mis compañeros y amigos del Laboratorio 19, con los que pasamos la mayor parte de buenos momentos. Gracias a Curro, gran persona y amigo, capaz siempre de sacarte una sonrisa. A Oscar, por ser mi "informático de confianza", al que siempre recurro cuando me enfrento a mi ordenador y nunca duda en ayudarme. A Santiago, a Elena, Andrea y Javier. Gracias también a Jose por tantos consejos que me das.

Gracias a Isa, sin ella habría sido muy difícil realizar este trabajo. Por encargarse con tanta dedicación a los ratones, sorprendiéndome tantas veces al ver que casi se conoce a los ratones uno a uno. Por su gran trabajo y dedicación con ellos. Por tantas conversaciones y tantas veces que me he desahogado con ella. Porque te has convertido en una amiga.

Quiero dar las gracias también a la Dra. Almudena Porras, al Dr. José Ramón González Porras, a la Dra. Consuelo González-Manchón, al Dr Miguel Pericacho y al Dr. Jesús Balsinde, quienes han aportado sus conocimientos e instalaciones en ocasiones para la realización de algunos experimentos.

Gracias a Sergio del Laboratorio 11, por todo lo que me aportas, por tu buen rollo y tu positividad ante la vida que eres capaz de transmitir a los demás.

Gracias a Ángel y a Ana, por esos buenos ratos en el confocal.

Gracias a Carlos, Sergio, Ester y el resto de compañeros de carrera y de casi de vida y que ahí están y estarán siempre.

Gracias a mis amigos de siempre, amigos de confianzas, y de tan buenos momentos. Gracias a Bea, Jeny, Raquel, Itamar, Jony, Manuela, Diego...

Y por supuesto agradecerle a mi familia, porque ellos son los responsables de lo que yo soy, sobre todo como persona. Gracias a Ekaitz, por su amor, su apoyo, comprensión y su esfuerzo ocupándose tantas veces de Iria cuando yo no he podido. Gracias a mi niña, Iria, el “amor de mi vida”, que con casi tres añitos has conseguido que mi vida gire en torno a ti. Gracias a mi madre y a Jose, pilares fundamentales en mi vida. Gracias por su cariño, su preocupación, su educación y su apoyo incondicional. Gracias a mi padre, a mi abuela, a Amalia, M^a Ángeles y M^a Angeles, Javier, Alfredo, Marta, Pablo, Liber, Enrique... Y gracias a Rosa, Valentín y el resto de la familia política... Gracias, muchas gracias a todos!

ABREVIATURAS

aa	Amino Ácido
ACD	Ácido Citrato-Dextrosa (<i>Acid Citrate-Dextrose</i>)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosin difosfato
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
APC	Aloficocianina (<i>Allophycocyanin</i>)
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosin Trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
Ca ²⁺	Calcio citosólico
CB	Secuencias de unión a Crk (<i>Crk-Binding</i>)
CD41	Subunidad αIIb de la integrina plaquetaria
CD61	Subunidad β3 de la integrina plaquetaria
CD62P	p-selectina
CD9	Proteína de Motilidad 1 (<i>Motility-Related Protein 1</i>)
CDC25-H	Dominio homólogo de la proteína CDC25 de <i>S. cerevisiae</i>
CNC	Dominio conservado no catalítico (<i>Conserved Noncatalytic</i>)
COX	Ciclooxigenasa
cPLA ₂	Fosfolipasa A2 citosólica
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
DAG	Diácilglicerol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
ERK1/2	Kinasa regulada por señales extracelulares (<i>Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2</i>)
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein IsoThioCyanate</i>)
fMLP	N-FormilMetionina-Leucil-Fenylalanina
FvW	Factor de Von Willebrand
GAP	Proteína activadora de la actividad GTPasa (<i>GTPase-activating protein</i>)
GDP	Guanosin Difosfato
GEF	Intercambiador de nucleótidos de guanina (<i>Guanine-nucleotide Exchange Factor</i>)
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico.
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G (<i>G-Protein Couple Receptors</i>)
GPIIb/IIIa	Integrina αIIbβ3
GST	Glutation S Transferasa
GTP	Guanosin Trifosfato
HEPES	Tampón 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IF	Inmunofluorescencia
IP3	Insositol 1,4,5-trifosfato (<i>Inositol 1,4,5-trisphosphate</i>)
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
K562	Línea celular eritroleucémica
KDa	Kilo Dalton
LAD-III	Síndrome de deficiencia de adhesión del leucocito
LMC	Leucemia mieloide crónica
LTB4	Leucotrieno B4
mA	Miliamperios

MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos (<u>Mitogen-Activated Protein Kinases</u>)
MAPKK	MAPK quinasa (<u>MAPKkinase</u>)
MAPKKK	MAPKK quinasa (<u>MAPKKKkinase</u>)
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón (<u>Mouse Embryonic Fibroblast</u>)
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero (<u>Messenger Ribonucleic Acid</u>)
MS	Espectrometría de Masas (<u>Mass Spectrometry</u>)
NO	Óxido Nítrico (<u>NitricOxide</u>)
ORF	Marco abierto de lectura (<u>Open Reading Frame</u>)
P2Y1, P2Y12	Receptores purinérgicos de ADP
PBS	Tampón fosfato salino (<u>Phosphate-BufferedSaline</u>)
PC12	Línea de feocromocitoma de médula suprarrenal de rata
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<u>Polymerase Chain Reaction</u>)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (<u>Platelet Derived Growth Factor</u>)
PE	Ficoeritrina (<u>Phycoerythrin</u>)
PF4	Factor plaquetario 4 (<u>Platelet Factor 4</u>)
PGE₂	Prostaglandina E2
PGH₂	Receptor de prostaglandina H2 (<u>Prostaglandin H2 Receptor</u>)
PGI₂	Prostaglandina I2
PH	Dominio de homología con pleckstrina (<u>Pleckstrin homology</u>)
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa (<u>Phosphatidylinositol 3-kinase</u>)
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (<u>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</u>)
PIP3	Fosfatidil inositol 3-fosfato (<u>Phosphatidylinositol 3 phosphate</u>)
PKA	Proteína Kinasa A
PKC	Proteína Kinasa C
PLCβ	Fosfolipasa Cβ
PMA	Forbol 12-Miristato 13-Acetato (<u>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</u>)
PMSF	Fluoruro de metil sulfonilo (<u>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</u>)
PP1/PP2	Proteína serina/treonina fosfatasas 1 / 2
PP2A	Proteína fosfatasa 2A (<u>Protein Phosphatase 2A</u>)
Pro	Prolina
PRP	Plasma Rico en Plaquetas (<u>Platelet Rich Plasma</u>)
Rap1	Ras-related protein 1
RBD	Dominio de unión a Ras (<u>Ras Binding Domain</u>)
REM	Motivo intercambiador de Ras (<u>Ras Exchange Motif</u>)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Sodio Dodecil Sulfato (<u>Sodium Dodecyl Sulfate</u>)
SDS-PAGE	Sodio Dodecil Sulfato-Electroforesis en gel de Poliacrilamida (<u>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</u>)
SEM	Error Estándar de la Media (<u>Standard Error of theMean</u>)
SH3-b	Dominio de unión a SH3 (<u>SH3-binding</u>)
TBS	Tampón salino Tris (<u>Tris-Buffered Saline</u>)
tgC3G	Transgénico para C3G
tgC3GΔCat	Transgénico para C3GΔCat
TGF-beta	Factor de crecimiento transformante (<u>Transforming Growth Factor</u>)
Thr/Tyr	Treonina/Tirosina
TSP-1	Trombospondina-1
TTBS	<u>Tween Tris Buffer Saline</u>
TXA₂	Tromboxano A ₂
TXB₂	Tromboxano B ₂
U	Unidades
VASP	Fosfoproteína estimuladora de vasodilatación (<u>Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein</u>)
WB	Western Blot
Y504/Tyr504	Tirosina 504

ÍNDICE

Abreviaturas.....	I
Lista de Figuras.....	IX
Lista de Tablas.....	XIII
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 C3G.....	3
1.1.1 Estructura.....	4
1.1.2 Fosforilación de C3G.....	5
1.1.3 Localización subcelular	6
1.1.4 C3G es una proteína multifuncional	7
1.1.4.1 C3G tiene una función esencial en adhesión celular	8
1.2 LA PLAQUETA.....	9
1.2.1 Fisiología de la hemostasia	10
a. <u>Hemostasia primaria</u>	10
b. <u>Hemostasia secundaria o coagulación</u>	12
c. <u>Fibrinólisis</u>	13
1.2.2 Rutas de señalización en plaquetas.....	13
1.2.2.1 Agonistas plaquetarios y sus receptores	15
a. <u>Trombina</u>	15
b. <u>Colágeno</u>	16
c. <u>ADP</u>	17
d. <u>Tromboxano A₂</u>	18
1.2.2.2 Inhibidores plaquetarios: PGI ₂ y óxido nítrico	18
1.2.2.3 La GTPasa Rap1 en plaquetas. Regulación por proteínas GEF y GAP ..	19
1.2.2.4 Rap1 es una molécula clave en la función plaquetaria	22
1.2.2.5 Funciones de PKC en la activación plaquetaria.....	24
1.2.2.6 Función de las MAPK en plaquetas.....	25
1.2.2.6.1 Activación y papel de ERK2 en plaquetas.....	26
1.2.2.6.2 p38 MAPK	27
1.2.2.6.3 Participación de MAPK en la ruta de síntesis del tromboxano	28
1.2.2.7 Shp2	29
1.3 FUNCIÓN DE LA RUTA C3G-RAP1 EN PLAQUETAS Y NEUTRÓFILOS.....	29
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	33
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37

3.1	MODELOS ANIMALES TRANSGÉNICOS UTILIZADOS	37
3.1.1	Genotipado de los ratones transgénicos por PCR	37
3.2	PURIFICACIÓN DE PLAQUETAS.....	38
3.2.1	Purificación y lisis de plaquetas para extracción de ARN.....	38
3.2.2	Purificación y lisis de plaquetas para extracción de proteínas	38
3.2.3	Purificación de plaquetas para inmunofluorescencia y análisis de la producción de Tromboxano A ₂	39
3.3	OBTENCIÓN DE MEGACARIOCITOS A PARTIR DE MÉDULA ÓSEA PARA EL ANÁLISIS DE ARN Y PROTEÍNAS.....	39
3.3.1	Extracción de médula ósea	39
3.3.2	Diferenciación de megacariocitos.....	39
3.4	RT-PCR SEMICUANTITATIVA	40
3.5	TIEMPO DE SANGRADO EN CORTES DE COLA.....	40
3.6	RECuento DE CÉLULAS SANGUÍNEAS	41
3.7	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE C3G EN PLAQUETAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	41
3.8	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE PLAQUETAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	42
3.9	ENSAYO DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA.....	44
3.9.1	Agregación plaquetaria mediante agregómetro.	44
3.9.2	Agregación plaquetaria por citometría de flujo.	45
3.10	INDUCCIÓN DE TROMBOSIS <i>IN VIVO</i>	48
3.10.1	Desarrollo de la operación	48
3.10.2	Procesamiento histológico	48
3.10.3	Evaluación del grado de trombosis	49
3.11	WESTERN BLOT	49
3.11.1	Obtención de extractos proteicos	49
3.11.2	Cuantificación de proteínas.....	49
3.11.3	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	49
3.11.4	Transferencia de las proteínas a membrana PVDF	50
3.11.5	Inmunodetección de las proteínas.....	50
3.11.6	Cuantificación.....	52
3.12	ENSAYO DE ACTIVACIÓN DE RAP1	52
3.12.1	Purificación de la proteína de fusión GST-RaIGDS-RBD	52
3.12.2	Ensayo de la actividad Rap1	53
3.13	ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE NEUTRÓFILOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	53

3.14 ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE C3G Y CO-LOCALIZACIÓN POR INMUNOFUORESCENCIA.....	54
3.15 ANÁLISIS DE PRODUCCIÓN DE TROMBOXANO A2 MEDIANTE HPLC/ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	55
3.15.1 Obtención de las muestras.....	55
3.15.2 Procesado de las muestras.....	55
3.15.3 Condiciones experimentales del análisis por HPLC/MS/MS	56
3.15.4 Análisis de los resultados.....	56
3.16 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
3.17 CONSIDERACIONES ÉTICAS.	56
4 ANTECEDENTES DEL GRUPO EN EL TEMA DE TRABAJO.....	61
4.1 GENERACIÓN DE DOS MODELOS TRANSGÉNICOS DE RATÓN.....	61
5 RESULTADOS.....	67
5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN C3G	67
5.2 LOS TRANSGENES C3G Y C3G Δ CAT ALTERAN LA FUNCIÓN HEMOSTÁTICA DE LAS PLAQUETAS.....	70
5.3 LOS RATONES TRANSGÉNICOS C3G MOSTRARON UN INCREMENTO EN EL NÚMERO DE NEUTRÓFILOS.....	73
5.4 LOS TRANSGENES C3G Y C3G Δ CAT MODIFICAN LA RESPUESTA DE LAS PLAQUETAS A SUS AGONISTAS	75
5.4.1 La sobreexpresión de C3G estimula la activación plaquetaria a través de su función GEF.	75
5.4.2 La sobreexpresión de C3G estimula la agregación plaquetaria a través de su función GEF.	77
5.5 LA SOBREEXPRESIÓN DE C3G AUMENTA LA TROMBOSIS IN VIVO	80
5.6 ACTIVACIÓN DE RAP1 EN PLAQUETAS TRANSGÉNICAS: RAP1 MEDIA EL EFECTO DE C3G	81
5.7 C3G ES UN IMPORTANTE MEDIADOR DE LA RUTA DE PKC QUE CONDUCE A LA ACTIVACIÓN DE RAP1.....	83
5.8 PKC ACTIVA C3G INDIRECTAMENTE, A TRAVÉS DE PROTEÍNAS TIROSINA KINASA.	84
5.9 ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE C3G EN LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN PLAQUETARIA REGULADAS POR ADP.	87
5.9.1 Estudio del efecto de inhibidores de los receptores de ADP sobre la activación plaquetaria.	88

5.9.2 Estudio del efecto de inhibidores de los receptores de ADP sobre la agregación plaquetaria.....	91
5.9.3 C3G ESTÁ INVOLUCRADO EN LA RUTA P2Y ₁₂ -PI3K QUE CONDUCE A LA ACTIVACIÓN DE Rap1	93
5.10 C3G REGULA LA SÍNTESIS DE TROMBOXANO A ₂	95
5.10.1 Estudio del efecto de la aspirina sobre la activación plaquetaria regulada por C3G.	95
5.10.2 Estudio del efecto de la aspirina sobre la agregación plaquetaria regulada por C3G.	97
5.10.3 Análisis de la producción de Tromboxano A ₂ en las plaquetas de ratones tgC3G y tgC3GΔCat.....	98
5.10.4 El TXA ₂ es un mediador de la activación de C3G inducida por trombina.	99
5.11 IMPLICACIÓN DE C3G EN LAS RUTAS DE ERK1/2 Y DE p38MAPK	101
5.11.1 Estudio del efecto de la inhibición de ERK1/2 y p38 MAPK sobre la activación de las plaquetas tgC3G y tgC3GΔCat.....	102
5.11.2 Estudio del efecto de la inhibición de ERK1/2 y p38 MAPK sobre la agregación de las plaquetas tgC3G y tgC3GΔCat.....	104
5.11.3 C3G no tiene efecto directo sobre la activación de las MAPK ERK1/2 y p38MAPK.	105
5.11.4 La activación de C3G depende, en parte, de la activación de las MAPK ERK1/2 y p38 MAPK.....	107
5.12 LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE C3G POR ERK ES INDEPENDIENTE DE SRC.	109
5.13 ERK REGULA LA ACTIVIDAD DE C3G POR INHIBICIÓN DE LA FOSFATASA SHP2	110
5.13.1 La desfosforilación de C3G en presencia del inhibidor de ERK1/2 es dependiente de Shp2.....	111
5.13.2 C3G y Shp2 co-localizan en la plaqueta permitiendo su interacción.....	113
5.13.3 Shp2 regula la actividad de C3G.....	115
6 DISCUSIÓN	119
6.1 C3G REGULA LA FUNCIÓN HOMEOSTÁTICA DE LAS PLAQUETAS.	119
6.2 LA EXPRESIÓN TRANSGÉNICA DE C3G EN PLAQUETAS INDUCE UN INCREMENTO EN EL NÚMERO DE NEUTRÓFILOS.....	120
6.3 C3G PARTICIPA EN LA ACTIVACIÓN DE RAP1 INDUCIDA POR TROMBINA A TRAVÉS DE PKC.....	122

6.4	C3G PARTICIPA EN LA SEÑALIZACIÓN DE RAP1 MEDIADA POR ADP-P2Y12-PI3K	125
6.5	C3G ESTÁ REGULADO POSITIVAMENTE POR ERK1/2 EN UN MECANISMO DEPENDIENTE DE LA TIROSINA FOSFATASA SHP2	128
7	CONCLUSIONES	135
8	BIBLIOGRAFÍA	1359
9	ANEXO	13553

LISTA DE FIGURAS

Introducción

Figura I-1. Ciclo de activación de las proteínas GTPasas pequeñas.....	3
Figura I-2. Representación esquemática de la estructura de C3G indicando sus dominios funcionales.....	5
Figura I-3. Participación de C3G en las rutas de señalización de Bcr-Abl.....	8
Figura I-4. Esquema del proceso de activación plaquetaria y formación del trombo.....	10
Figura I-5. Representación esquemática de las interacciones de las plaquetas.....	11
Figura I-6. Representación esquemática del balance entre coagulación y trombosis.....	12
Figura I-7. Esquema de las principales rutas de señalización plaquetaria donde participa Rap1.....	15
Figura I-8. Esquema de las principales rutas de señalización plaquetarias, a partir de receptores acoplados a proteínas G, que activan a Rap1.....	18
Figura I-9. Expresión de proteínas RAS/RAP, GEF y GAP en plaquetas.....	20
Figura I-10. Esquema de la regulación de Rap1 en plaquetas. Rap1 está regulado por el balance de actividad de CalDAG-GEFI y RASA3.....	21
Figura I-11. Activación secuencial de Rap1.....	23
Figura I-12. Las plaquetas knock out para CalDAG-GEFI responden a altas concentraciones de trombina y PMA.....	23
Figura I-13. Representación esquemática de las rutas de activación de Rap1 por trombina.....	24
Figura I-14. Activación de la MAPK ERK2 en plaquetas.....	26
Figura I-15. Modelo de regulación negativa de CalDAG-GEFI por ERK1/2.....	27
Figura I-16. Activación de la MAPK p38 en plaquetas.....	28
Figura I-17. Expresión de los genes ITGAV y GP1BB en diferentes clones de células K562.....	30

Materiales y Métodos

Figura M-1. Ensayo de agregación por citometría de flujo.....	47
--	----

Antecedentes

Figura A-1. Representación esquemática de los plásmidos PF4-C3G-LN (9.8Kb) y PF4-C3GΔCat-LN (9.3Kb) utilizados para generar los ratones transgénicos C3G y C3GΔCa respectivamente.....	61
Figura A-2. Análisis genómico de las construcciones PF4-C3G-LN y PF4-C3GΔCat-LN.....	62
Figura A-3. Análisis de los clones transgénicos C3G y C3GΔCat mediante Southern blot del ADN genómico (20 μg) extraído de los clones indicados, C3G y C3GΔCat.....	63
Figura A-4. Análisis por PCR de clones C3G-6A6 positivos a partir de ADN genómico extraído de los clones correspondientes.....	63

Resultados

Figura R-1. Análisis de la expresión de los transgenes C3G y C3GΔCat por RT-PCR.....	68
Figura R-2. Expresión del transgén C3GΔCat en tejidos.....	69
Figura R-3. Análisis de la expresión proteica de los transgenes C3G y C3GΔCat en células diferenciadas de médula ósea.....	69
Figura R-4. Detección específica de los niveles de C3G intracelular por citometría de flujo....	70
Figura R-5. Los ratones transgénicos muestran una hemostasia alterada.....	71
Figura R-6. La expresión transgénica de C3G en plaquetas induce un incremento en el número de neutrófilos.....	74
Figura R-7. Comprobación del incremento del número de neutrófilos mediante frotis de sangre.....	74
Figura R-8. Las plaquetas de ratones tgC3G y tgC3GΔCat son activadas de forma diferencial en respuesta a agonistas.....	76
Figura R-9. Los animales transgénicos muestran alteraciones en la agregación plaquetaria..	78
Figura R-10. Representación del grado de agregación de plaquetas de ratones transgénicos en respuesta a diferentes agonistas.....	79
Figura R-11. La expresión transgénica de C3G incrementa la trombosis <i>in vivo</i>	80
Figura R-12. Análisis de la presencia de trombos pulmonares mediante cortes histológicos..	81
Figura R-13. Rap1 se regula de forma diferencial en plaquetas de animales transgénicos C3G y C3GΔCat.....	82
Figura R-14. C3G participa en la activación de Rap1 mediada por PKC.....	83
Figura R-15. C3G participa en la activación plaquetaria a través de la ruta PKC-Rap1.....	84
Figura R-16. La fosforilación de los transgenes C3G y C3GΔCat en plaquetas está regulada por la activación de PKC.....	85
Figura R-17. Efecto de diferentes inhibidores de rutas de señalización plaquetarias sobre (A) activación o (B) agregación.....	87
Figura R-18. Las plaquetas de ratones transgénicos C3G son más sensibles al tratamiento con clopidogrel en respuesta a la trombina.....	88
Figura R-19. Las plaquetas de ratones tgC3G son más sensibles al tratamiento con clopidogrel cuando son activadas por ADP, mientras que las plaquetas C3GΔCat muestran mayor resistencia.....	89
Figura R-20. El transgén C3G tiene una modesta participación en la ruta ADP-P2Y1.....	90
Figura R-21. MRS2179 inhibe drásticamente la activación de la integrina plaquetaria por la ruta ADP-P2Y1.....	91
Figura R-22. El clopidogrel inhibe la agregación de plaquetas tgC3G estimuladas con trombina en mayor porcentaje que la de plaquetas silvestres, mientras que las plaquetas tgC3GΔCat muestran la tendencia opuesta.....	92

Figura R-23. La inhibición de la agregación por MRS2179 no se ve afectada por la expresión de los transgenes C3G y C3GΔCat.....	93
Figura R-24. C3G participa en la activación de Rap1 por la ruta de señalización P2Y12-PI3K	94
Figura R-25. Las plaquetas de ratones tgC3G y tgC3GΔCat activadas con trombina muestran diferente sensibilidad al pretratamiento con aspirina.....	96
Figura R-26. Las plaquetas de ratones tgC3G son más sensibles al pretratamiento con aspirina previo a la activación por ADP	97
Figura R-27. El pretratamiento con aspirina induce una mayor inhibición de la agregación de plaquetas de ratones tgC3G estimuladas con trombina que las de plaquetas silvestres.....	98
Figura R-28. El transgén C3G regula negativamente la producción de TXB ₂ en plaquetas estimuladas con trombina	99
Figura R-29. La fosforilación de los transgenes C3G y C3GΔCat se ve afectada por la inhibición de la síntesis de TXA ₂	100
Figura R-30. Las plaquetas tgC3G son más sensibles a los inhibidores de ERK1/2 y p38 MAPK, U0126 y SB203580, en respuesta a trombina.....	102
Figura R-31. Las plaquetas tgC3G son más sensibles al tratamiento con SB203580 y U0126 en respuesta a la activación por ADP.....	103
Figura R-32. La agregación de plaquetas tgC3G estimuladas con trombina es más sensible a la inhibición por SB203580 y U0126.....	104
Figura R-33. La activación de ERK y p38α MAPK por trombina es independiente de C3G.....	106
Figura R-34. C3G es fosforilado en plaquetas estimuladas por trombina mediante un mecanismo que implica a las MAPK ERK1/2 y p38 MAPK.....	108
Figura R-35. La fosforilación de C3G mediada por Src no está regulada por ERK1/2.....	110
Figura R-36. La fosfatasa Shp2 regula la fosforilación de C3G en plaquetas estimuladas por trombina	112
Figura R-37. Las plaquetas tgC3G muestran una mayor co-localización entre p-C3G y Shp2 en ausencia de p-ERK1/2.....	114
Figura R-38. La inhibición de Shp2 incrementa los niveles de Rap1-GTP.....	115
Discusión	
Figura D-1. Modelo propuesto de la participación de C3G en la activación de Rap1 por trombina en plaquetas de ratón.....	124
Figura D-2. Representación esquemática de la participación de C3G en la activación de Rap1 a través de la ruta ADP-P2Y12.....	126
Figura D-3. Representación esquemática de la participación de C3G en la ruta síntesis y señalización del TXA ₂	130

LISTA DE TABLAS

Materiales y Métodos

Tabla M-1. Anticoagulantes utilizados para la obtención y manipulación de plaquetas de ratón	38
Tabla M-2. Tabla de oligonucleótidos.....	40
Tabla M-3. Anticuerpos utilizados para ensayos de citometría de flujo	42
Tabla M-4. Agonistas plaquetarios utilizados	43
Tabla M-5. Inhibidores de diferentes rutas de señalización plaquetaria utilizados	44
Tabla M-6. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas.....	51

Resultados

Tabla R-1. Los transgenes C3G y C3GΔCat no modifican el número de plaquetas	72
Tabla R-2. Recuento de eritrocitos (<i>Red Blood Cells</i> , <i>RBC</i>) y valores relacionados con la serie roja en ratones transgénicos C3G y C3GΔCat y sus controles silvestres	72
Tabla R-3. El transgén C3G incrementa el número de neutrófilos en sangre periférica	73

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 C3G

C3G es un factor activador del intercambio de nucleótidos de guanina o GEF (*Guanine-nucleotide Exchange Factor*) de dos miembros de la familia de proteínas Ras: Rap1 (Gotoh *et al* 1995) y R-Ras (Gotoh *et al* 1997) y también es capaz de estimular ligeramente el intercambio de GDP por GTP en otras proteínas Ras, como H-Ras, N-Ras y RalA, pero con mucha menor eficiencia que sus GEF específicos, Sos y RalGDS, respectivamente (Gotoh *et al* 1995). C3G también tiene actividad GEF sobre la GTPasa TC10, perteneciente a la familia Rho (Gotoh *et al* 1995; Ohba *et al* 2000; Chiang *et al* 2001). Las proteínas Ras y Rho pertenecen a la super familia de pequeñas GTPasas que regulan la señalización actuando como pequeños “interruptores” que alternan entre estados de conformación activa, cuanto están unidas a GTP, y estados inactivos, cuanto están unidos a GDP (Figura I-1). La transición al estado activo está condicionada por la acción de proteínas GEF que facilitan el intercambio de GDP por GTP, mientras que el paso al estado inactivo depende de la hidrólisis del GTP a GDP por parte de las propias GTPasas, pero incrementada por las proteínas activadoras de la actividad GTPasa o GAP (*GTPase-activating protein*) (Bos *et al* 2007) (Figura I-1).

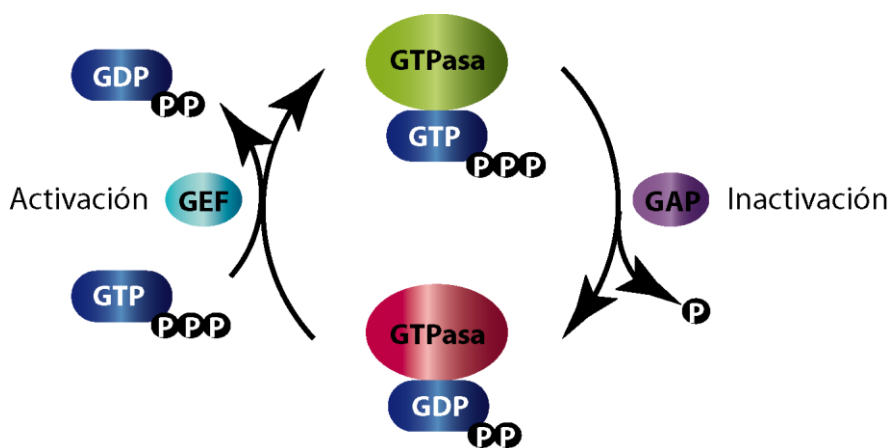


Figura I-1. Ciclo de activación de las proteínas GTPasas pequeñas. Las GTPasas actúan como interruptores moleculares de las rutas de señalización. Las GTPasas pasan de un estado inactivo cuando están unidas a GDP a un estado activo cuando están unidas a GTP en un proceso catalizado por proteínas GEF. Para volver al estado inactivo hidrolizan el GTP a GDP en un proceso favorecido por proteínas GAP. P: grupos fosfato.

La proteína C3G fue identificada por el grupo de Mitsuhiro Matsuda en el año 1994 (Tanaka *et al* 1994b). Estos investigadores habían observado que en células PC12 (línea neuronal de feocromocitoma de rata) la diferenciación neuronal inducida por Crk se bloqueaba cuando se sobreexpresaban péptidos que se unían al dominio SH3 de Crk, sugiriendo que este dominio de Crk mediaba interacciones proteína-proteína. En base a estas observaciones, el grupo de Matsuda se centró en identificar posibles proteínas que interaccionaban con Crk a través del dominio SH3, común a las dos isoformas de Crk, c-CrkI y c-CrkII, y a la forma oncogénica v-Crk (Matsuda *et al* 1992). Con este fin rastrearon una genoteca de cADN extraída de placenta humana utilizando como cebo el dominio SH3 amino de c-Crk. A partir de esta búsqueda obtuvieron la secuencia completa de un gen de 4070 pb, generado a partir de la combinación de cinco pequeñas secuencias solapantes, que presentaba un marco de lectura abierto (ORF) de 3231 pb y que codificaba una proteína de 1077 kDa. A esta proteína se la denominó C3G por Crk SH3 domain-binding Guanine nucleotide exchange factor. En la literatura se pueden referir a C3G con otros nombres alternativos como RapGEF1 (el nombre canónico), GRF2 y DKFZ p781P1719.

1.1.1 Estructura

La proteína C3G tiene un tamaño de 140 kDa y consta de varios dominios modulares bien diferenciados entre sí, tanto estructural como funcionalmente (Figura I-2). Estos dominios característicos son comunes a otras proteínas GEF y algunos de ellos son parte esencial de uniones específicas con otras proteínas.

En el extremo carboxilo terminal se encuentra la **región catalítica**, característica de los GEF activadores de la familia de genes Ras. Esta región comprende unos 250 pb y es la responsable del intercambio de moléculas de GDP por GTP que hay libre en el medio dando lugar a la activación de proteínas Ras. Este dominio también recibe el nombre de **CDC25-H** (homólogo de la proteína CDC25 de *S. cerevisiae*) ya que el gen CDC25 fue el primer GEF de Ras identificado (Camonis *et al* 1986) y engloba cinco regiones estructuralmente conservadas (SCR) (Boguski *et al* 1993; Rebhun *et al* 2000).

Otro dominio importante de la proteína es el **dominio REM**, cuyo nombre procede de las siglas Ras-Exchange-Motif, también denominado SCR0 (al estar en posición N-terminal de la primera región estructuralmente conservada del dominio catalítico o SCR1) o CNC (Conserved Noncatalytic). En un primer momento se pensó que esta región era la responsable de la unión de los GEF a Ras (Fam *et al* 1997). Pero al estudiar la estructura tridimensional mediante rayos-X de Sos1, uno de los GEF de Ras, se vio que el dominio REM forma una zona hidrofóbica donde se acoplan los residuos I956 y F958, presentes en la región SCR4 del dominio catalítico,

estabilizando y abriendo la estructura de horquilla helicoidal adoptada por el sitio de unión del GTP, pero que no interacciona con Ras (Boriack-Sjodin *et al* 1998). Se ha visto que en el complejo ternario formado por Ras•GTP:SOS^{cat}:Ras, el dominio REM participa en un mecanismo alostérico en el que Ras•GTP estabiliza SOS^{cat} y estimula su actividad intercambiadora (Margarit *et al* 2003).

Por otro lado, en la región central de la proteína se encuentra un **dominio rico en prolinas (SH3-b** por *SH3-binding*), dominio por el cual C3G se une a la proteína adaptadora Crk (Knudsen *et al* 1994; Tanaka *et al* 1994a), a p130Cas (Knudsen *et al* 1994; Kirsch *et al* 1998) y a Abl, entre otras muchas proteínas (Gutierrez-Berzal *et al* 2006; Maia *et al* 2013). Se han identificado cuatro pequeñas secuencias CB (*Crk-Binding*) dentro del dominio SH3-b que siguen la secuencia consenso Pro-X-X-Pro típica de las regiones de unión a dominios SH3 (Chen *et al* 1994; Knudsen *et al* 1994). Además, las cuatro secuencias de poliprolinas de C3G siguen el patrón consenso de secuencias que se unen al dominio SH3 de Crk y Grb2 como las que aparecen en las proteínas Abl, Arg y Sos (Ren *et al* 1994; Feller *et al* 1995; Wang *et al* 1996). En posición amino de la región de unión a Crk, y concretamente entre los residuos 247 y 280, se encuentra otra región rica en prolinas que, tanto *in vivo* como *in vitro*, se une a la proteína p130Cas (*Crk-associated substrate*) (Knudsen *et al* 1994). Esta región no tiene afinidad por otros dominios SH3 —como el de Crk— al ser, tanto su composición aminoacídica como el orden de prolinas, diferentes a la secuencia consenso.

Finalmente, se ha identificado en el extremo más amino terminal de la molécula un **sitio de unión específico para E-cadherina** (Hogan *et al* 2004) (Figura I-2).

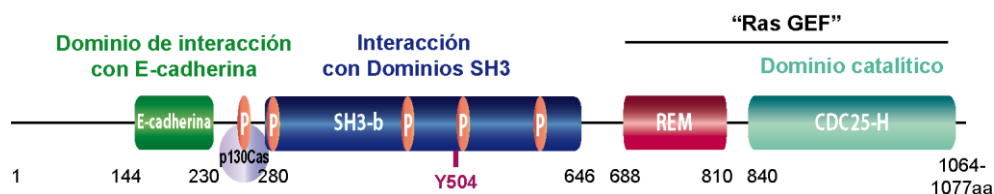


Figura I-2: Representación esquemática de la estructura de C3G indicando sus dominios funcionales. Se indica también los aminoácidos (aa) primero y último de cada dominio. CDC25-H: dominio catalítico. SH3-b: región de unión a dominios SH3. REM: *Ras Exchange motif*. Sitios P: tramos de poliprolinas.

1.1.2 Fosforilación de C3G

Como se ha dicho anteriormente, C3G tiene un dominio rico en prolinas que interacciona con el dominio SH3 de Crk (Knudsen *et al* 1994; Tanaka *et al* 1994a; Tanaka *et al* 1994b). Dicho dominio contiene un residuo de tirosina en la posición 504 (Y504) (Figura I-2). En estudios

previos se ha observado que esta tirosina se fosforila cuando C3G se coexpresa con Crkl. Además, la fosforilación de C3G en Y504 aumenta su actividad catalítica (Ichiba *et al* 1999). Actualmente se sabe que C3G es fosforilada en el residuo Y504 por las kinasas asociadas a membrana Src, Hck y c-Abl, pero es necesaria la previa interacción con Crk formando el complejo Crk-C3G para su translocación a la membrana plasmática (Radha *et al* 2011). Además se ha demostrado que Src está regulando la activación de C3G, no solo por fosforilación en la Y504, sino también por la fosforilación de Crk en la tirosina 221, lo que conduce a la disociación de los complejos Crk-C3G (Ferrando *et al* 2012). También, se ha visto, que en el crecimiento celular inducido por hormonas, la activación y fosforilación de C3G requiere las kinasas c-Src y Jak2 (Ling *et al* 2003). En el caso de la interacción de C3G con Hck, que es directa, ésta puede estar mediada, al menos en parte, por el dominio SH3 de Hck y el dominio de poliprolinas de C3G. Esta interacción, que es muy específica, produce de forma predominante la fosforilación de la Y504 aunque no se descarta que Hck fosforile otras tirosinas de C3G (Shivakrupa *et al* 2003; Ferrando *et al* 2012). Una de las consecuencias de la interacción entre C3G y Hck es la inducción de apoptosis en células hematopoyéticas (Shivakrupa *et al* 2003). La interacción con C3G provoca una alteración en la actividad de Hck, lo que conlleva la fosforilación de proteínas específicas de apoptosis por parte de Hck (Shivakrupa *et al* 2003). Recientemente se ha identificado una nueva modificación postraducciona de C3G, la fosforilación de la serina 233 mediada por Cdk5/p53, que regula la actividad y estabilidad de Rap1 en neuronas (Utreras *et al* 2013).

La actividad de C3G también puede estar autorregulada mediante una autoinhibición de la molécula ya que se ha visto que la delección de los aminoácidos 1-579, que comprenden la región N-terminal y parte de la región SH3-b, provoca una activación constitutiva de la molécula (Ichiba *et al* 1999). Adicionalmente, se ha demostrado que el efecto autoinhibitorio de la región N-terminal sobre la actividad catalítica se debe a interacciones intramoleculares con el dominio REM pasando la proteína a una conformación autoinhibida (Gómez-Hernández 2014)

1.1.3 Localización subcelular

C3G se localiza principalmente en el citoplasma pero es importante su participación en funciones relacionadas con la membrana donde, como se ha mencionado, es activada mediante fosforilación de la Y504 por kinasas asociadas a la membrana como Src o Hck (Shivakrupa *et al* 2003; Radha *et al* 2004). Esta translocación está mediada por la interacción entre los dominios ricos en prolina de C3G y el dominio NT-SH3 de Crk, que a su vez interacciona por su dominio SH2 con fosfotirosinas del receptor (Matsuda *et al* 1992; Knudsen *et al* 1995). Por tanto, la interacción con Crk se podría considerar como un mecanismo de reclutamiento a la membrana, ya que la farnesilación de C3G induce su localización permanente en la membrana y su

activación constitutiva (Ichiba *et al* 1997; Ichiba *et al* 1999). Se ha visto que C3G fosforilado en la Tyr504 se localiza, tanto en Golgi como en la zona subcortical del citoesqueleto de actina (Radha *et al* 2004).

1.1.4 C3G es una proteína multifuncional

Se ha descrito la participación de C3G en múltiples funciones celulares como proliferación, diferenciación, migración celular, estimulación de adhesión, apoptosis y mantenimiento de los contactos célula-célula (York *et al* 1998; Kao *et al* 2001; Hogan *et al* 2004), revisado en Radha, 2011 (Radha *et al* 2011). En algunos casos se ha relacionado a C3G con la alteración de ciertas rutas de señalización, tales como las rutas de ERK1/2 o JNK a través de su efecto activador sobre Rap1 o R-Ras (York *et al* 1998; Ishimaru *et al* 1999; Mochizuki *et al* 2000).

Nuestro grupo ha descrito la existencia de una relación funcional entre C3G y la MAPK p38 en el efecto apoptótico de STI-571 (Imatinib mesylato, Gleevec, Glivec, CGP 57148) en la línea celular de leucemia mieloide crónica (LMC), K562. STI-571 inhibe directamente la actividad de la kinasa Bcr-Abl provocando un mecanismo apoptótico dependiente de mitocondrias que requiere la activación de las caspasas 9 y 3 (Jacquel *et al* 2003). Hay evidencias que indican que C3G y p38 MAPK intervienen en este proceso. STI-571 activa p38 MAPK (concretamente p38 α) por fosforilación. C3G es un regulador negativo de p38 α y, por lo tanto, un inhibidor de la apoptosis inducida por STI-571 (Maia *et al* 2009), efecto que está mediado por su diana Rap1. C3G también regula la apoptosis, a través de la regulación negativa de p38 MAPK en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) sometidos a diferentes estímulos de estrés (Gutiérrez-Uzquiza *et al* 2010). Las rutas en las que participa C3G a través de Rap1 contribuyen a la inducción del fenotipo maligno provocado por la fusión génica Bcr-Abl mediante dos procesos: inhibición de las vías pro-apoptóticas, como la vía en la que interviene p38 MAPK, y la estimulación de la supervivencia y proliferación celular a través de las cascadas de Akt y ERK (Maia *et al* 2009). Sin embargo, C3G también regula negativamente la proliferación y supervivencia celular a través de rutas independientes de Rap1 (Guerrero *et al* 1998; Guerrero *et al* 2004; Martin-Encabo *et al* 2007; Maia *et al* 2009; Gutiérrez-Uzquiza *et al* 2010) (Figura I-3). Concretamente, C3G antagoniza el crecimiento tumoral inducido por varios oncogenes como Ras, Raf, Sis, R-Ras y Dbl, a través de mecanismos independientes de su actividad GEF (Guerrero *et al* 1998; Guerrero *et al* 2004; Martin-Encabo *et al* 2007). Específicamente, la sobreexpresión de C3G en fibroblastos NIH3T3 inhibe la fosforilación de ERK1/2, a través de la activación de la fosfatasa PP2A. La inhibición de ERK1/2 conduce a una menor expresión de ciclina A, provocando la pérdida de la capacidad de crecimiento

independiente de anclaje al sustrato propia del crecimiento tumoral (Martin-Encabo *et al* 2007). Por tanto, en este contexto, C3G podría ser considerado como un gen supresor de tumores.

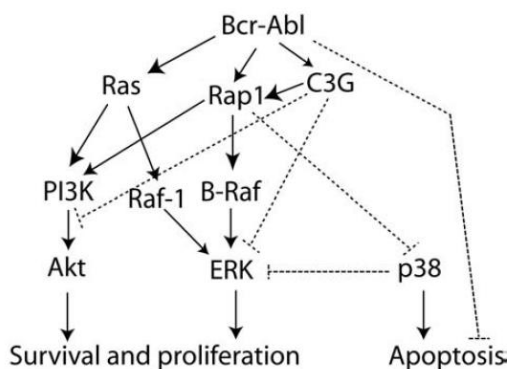


Figura I-3. Participación de C3G en las rutas de señalización de Bcr-Abl. En células de LMC, Rap1 es un mediador del efecto inhibitor de C3G sobre p38 MAPK, pero regula a ERK y Akt de forma independiente de Rap1. Las rutas activadoras se representan con líneas sólidas, mientras que las inhibidoras se representan con líneas punteadas. Imagen sacada de (Maia *et al* 2009).

Recientemente, utilizando como modelo de estudio la línea celular eritroleucémica K562, así como modelos animales transgénicos para C3G en megacariocitos y plaquetas, nuestro grupo ha demostrado la implicación de C3G en la diferenciación y maduración de los megacariocitos, así como en su migración hacia el nicho vascular y posterior formación de proplaquetas (Ortiz-Rivero, 2017).

Otras importantes funciones de C3G incluyen un papel regulador en el desarrollo del córtex cerebral (Voss *et al* 2006; Radha *et al* 2008; Voss *et al* 2008) así como en la maduración vascular (Voss *et al* 2003) y en la maduración y expansión de los timocitos (Wang *et al* 2008). C3G participa en el transporte de glucosa en adipocitos y células musculares (Gual *et al* 2002; Chiang *et al* 2006; Sayem *et al* 2018), habiéndose relacionado con el desarrollo de diabetes tipo 2 (Hong *et al* 2009) y se ha descrito que la ruta C3G-Rap1 está implicada en la patogénesis de la glomerulonefritis (Rufanova *et al* 2009; Rufanova *et al* 2010).

1.1.4.1 C3G tiene una función esencial en adhesión celular

Existen muchas evidencias de que C3G participa en adhesión celular. De hecho, C3G es un gen esencial para el desarrollo embrionario, debido a sus funciones en adhesión y migración celular mediada por integrinas (Uemura *et al* 1999; Ohba *et al* 2001). Algunas proteínas de la matriz extracelular, al interaccionar con integrinas, son capaces de inducir la fosforilación de la Tyr504 de C3G (Figura I-2) (Ichiba *et al* 1999), lo que favorece su activación y la formación de complejos con las proteínas Crk y p130Cas (Arai *et al* 1999). Estos datos se complementan con los resultados obtenidos a partir de los estudios con células MEF deficientes en C3G, donde se

ha relacionado la ausencia de C3G con la deficiencia de la activación de Rap1, lo que provoca una inhibición de la adhesión celular, desajustes de la expansión celular y aumento de la migración celular (Ohba *et al* 2001). Además, nuestro grupo ha demostrado la participación de C3G en la formación de los complejos de adhesión focal mediante su interacción con proteínas como Abl, p38 α MAPK, Cbl, p130Cas, Abi1, FAK y paxilina en la línea eritroleucémica K562 (Maia *et al* 2013).

1.2 LA PLAQUETA

Las plaquetas, o trombocitos, son fragmentos citoplasmáticos de pequeño tamaño (2-3 μ m de diámetro), irregulares y carentes de núcleo. Las plaquetas se forman en la médula ósea por un proceso llamado trombopoyesis. Este proceso implica la fragmentación de los bordes citoplasmáticos de las células precursoras de las plaquetas que son los megacariocitos, proceso estimulado por la hormona trombopoyetina. Una vez formadas, las plaquetas salen al torrente sanguíneo donde su vida media oscila entre 8 y 12 días y finalmente son destruidas por fagocitosis en el hígado y en bazo. Las plaquetas juegan un papel fundamental en la hemostasia y son una fuente natural de factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por *Platelet Derived Growth Factor*), un potente agente quimiotáctico, y el factor de crecimiento transformante beta, (TGF-beta, por *Transforming Growth Factor*) el cual estimula el depósito de matriz extracelular (Revisado por Charles S Abrams, 2012).

Las plaquetas presentan en su citoplasma diferentes tipos de gránulos entre los que se caracterizan los gránulos α y los gránulos densos o δ . Los gránulos α contienen una amplia variedad de péptidos y proteínas como factor 4 plaquetario (PF4), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF beta 1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), fibronectina, β -tromboglobulina, factor de Von Willebrand (FvW), moléculas de adhesión a membrana como P-selectina (Stenberg *et al* 1985), fibrinógeno, y los factores de coagulación, V y XIII. Los gránulos densos contienen principalmente ADP, ATP calcio y serotonina (Revisado por Charles S Abrams, 2012) (Figura I-3).

Las plaquetas circulan en la sangre de todos los mamíferos y están involucradas en la hemostasia, iniciando la formación de coágulos o trombos.

1.2.1 Fisiología de la hemostasia

La hemostasia es el resultado de un delicado equilibrio que permite prevenir de forma continua la pérdida de sangre y detener la hemorragia ante un daño vascular, sin alterar la fluidez sanguínea.

En condiciones fisiológicas, las plaquetas circulan en sangre en un estado de quiescencia sin interaccionar con el endotelio. En esta situación, las plaquetas están expuestas a una serie de señales inhibitorias, como son la presencia en circulación de óxido nítrico (NO) y prostaciclina endoteliales (prostaglandina I_2 , PGI_2), que previenen su activación en ausencia de estímulo (Figura I-4) (Smolenski 2012).

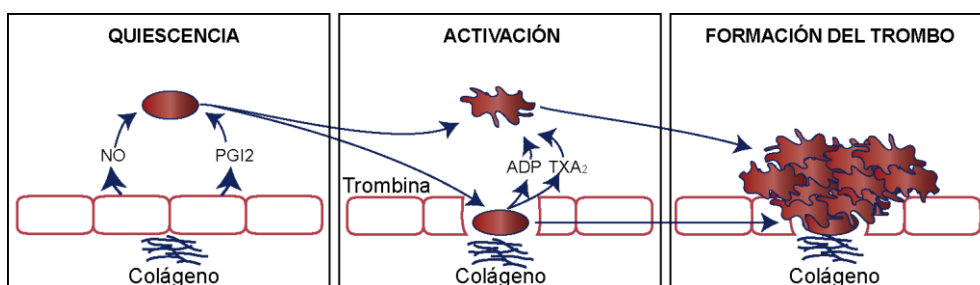


Figura I-4. Esquema del proceso de activación plaquetaria y formación del trombo. En estado de quiescencia la plaqueta se encuentra inactiva por la acción del NO y PGI_2 . Al alterarse el endotelio y quedar expuesto el colágeno comienza el proceso de activación plaquetaria, desencadenando finalmente la formación del trombo para prevenir la hemorragia. TXA_2 : Tromboxano A_2 .

En el proceso de hemostasia se diferencian tres etapas: a) hemostasia primaria, b) hemostasia secundaria o coagulación, y c) fibrinólisis.

a. Hemostasia primaria

Cuando se produce un daño que altera la integridad del endotelio, se produce un espasmo vascular, reduciéndose el flujo sanguíneo en la zona. Las plaquetas quedan expuestas al colágeno y al FvW del tejido conectivo que hay bajo el endotelio e interaccionan con ambas moléculas. La interacción con el colágeno, proceso conocido como “adhesión plaquetaria”, aporta a las plaquetas una superficie de interacción pero además constituye un potente estímulo para la activación plaquetaria. El resultado es la activación de distintas vías de señalización intracelular, las cuales desencadenan cambios en la forma de las plaquetas que les permite extenderse a través de las fibras de colágeno al mismo tiempo que comienzan a secretar tromboxano A_2 (TXA_2) y ADP a la circulación (Smyth *et al* 2009). El TXA_2 y el ADP liberados por las plaquetas estimulan a las plaquetas adyacentes desencadenando en ellas el mismo efecto de activación y por lo tanto una amplificación de la señal (Figura I-4).

Las plaquetas activadas también se unen directamente al fibrinógeno a través de la integrina plaquetaria o glicoproteína GPIIb/IIIa, también conocida como $\alpha IIb\beta 3$ (Shattil *et al* 2004; Collier *et al* 2008). En condiciones fisiológicas, la afinidad de este receptor por su ligando es muy baja. Durante el proceso de activación plaquetaria se producen cambios celulares y moleculares que inducen la activación del receptor aumentando la afinidad por su ligando. El fibrinógeno se puede unir al mismo tiempo a dos receptores de este tipo, de forma que el fibrinógeno actúa como enlace entre dos plaquetas (Figura I-5), lo que se conoce como “puente de fibrinógeno”. Esta interacción plaqueta-fibrinógeno-plaqueta inicia el proceso de agregación plaquetaria. Puesto que cada plaqueta tiene entre 40.000 y 80.000 copias del receptor $\alpha IIb\beta 3$ en superficie, los agregados que se forman pueden llegar a alcanzar gran tamaño y ensamblarse en el sitio de activación formando así el tapón hemostático primario, que no está estabilizado. La estabilización de este tapón ocurre durante la hemostasia secundaria (Bennett *et al* 1979; Wagner *et al* 1996).

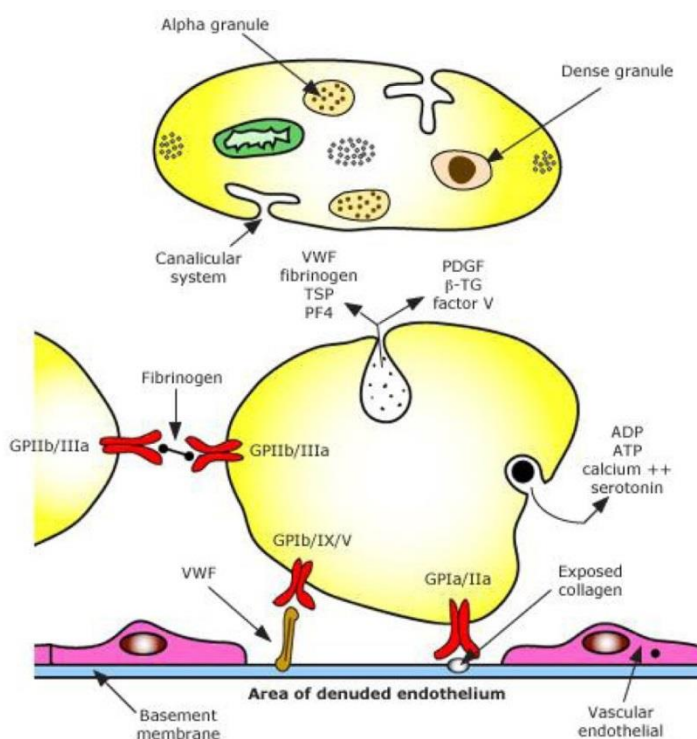


Figura I-5: Representación esquemática de las interacciones de las plaquetas. El esquema superior muestra una plaqueta inactiva, destacando los gránulos α y los gránulos densos junto con el sistema canalicular. El esquema inferior muestra la mayoría de las funciones plaquetarias incluyendo la secreción de productos almacenados, interacción con fibrinógeno, interacciones con el endotelio y con otras plaquetas. VWF: Factor de von Willebrand; TSP: trombospondina; PF4: factor plaquetario 4; β -TG: beta tromboglobulina. Sacado de Abrams, CS, Platelet Biology, UpToDate, 2012

b. Hemostasia secundaria o coagulación

La hemostasia secundaria se divide en varias vías, la vía extrínseca o del factor tisular y la vía intrínseca o de activación por contacto. Ambas vías ocurren simultáneamente y confluyen en la activación del factor X, un zimógeno de serin-proteasas que se activa dando el factor Xa capaz de activar la trombina. La vía extrínseca comienza con el factor tisular, que se expresa en todas las células no vasculares y queda expuesto a la sangre circulante por la rotura de la capa endotelial protectora de la vasculatura. El factor tisular puede interactuar con el factor VII activándolo a factor VIIa que a su vez activa al factor X en factor Xa. La vía intrínseca comienza cuando la sangre entra en contacto con el colágeno, el cual queda expuesto bajo el endotelio cuando se altera la integridad de éste, y que es capaz de activar el factor XII en XIIa. La ruta intrínseca también termina con la activación del factor X junto con la ruta extrínseca. El factor Xa resultante de la confluencia de ambas rutas provoca la activación de protrombina en trombina, el agonista más potente de las plaquetas capaz de formar fibrina a partir del fibrinógeno (Furie *et al* 2008, 2012).

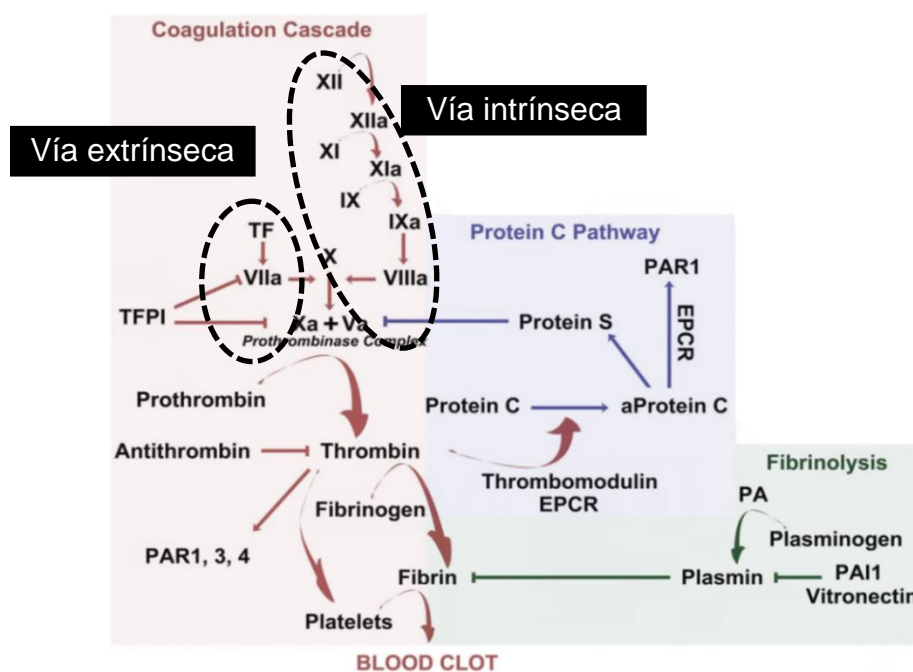


Figura I-6: Representación esquemática del balance entre coagulación y trombosis. La activación de la plaqueta puede ocurrir por varias vías dependientes de colágeno, trombina, ADP, serotonina y TXA_2 , entre otros. En el esquema se observan las diferentes vías de coagulación, intrínseca y extrínseca. También se observan las rutas de regulación del proceso (Verde y Azul). TF, Factor Tisular (*Tissue Factor*); TFPI, Inhibidor de la ruta del Factor Tisular (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*); PAR, Receptor Activador de Proteasas (*Proteases Activated Receptors*); EPCR, Receptor Endotelial de la Proteína C (*Endothelial Protein C Receptor*); PA, Activador del Plasminógeno (*Plasminogen Activator*); PAI, Inhibidor del Activador del Plasminógeno (*Plasminogen Activator Inhibitor*) (Ben Shimon *et al* 2015).

Las plaquetas también facilitan este proceso al proporcionar los fosfolípidos procoagulantes, como fosfatidil serina y fosfatidil colina, que incrementan la actividad del factor VIIa (Komiyama *et al* 1990; Mann *et al* 1992) (Figura I-6).

En consecuencia, la activación de la plaqueta y la formación de fibrina a partir del fibrinógeno por acción de la trombina (Mosesson 2005) son dos procesos íntimamente unidos que provocan la formación de un entramado, permitiendo el crecimiento y compactación del tapón hemostático (Furie *et al* 2012).

c. Fibrinolisis

La fibrinolisis es el proceso por el cual se elimina el trombo formado con el fin de regular la hemostasia. El principal componente de este proceso es la plasmina, que es una enzima proteolítica cuya forma inactiva es el plasminógeno. La plasmina rompe los enlaces de fibrina y también las moléculas de fibrinógeno impidiendo que se siga polimerizando, provocando finalmente la desaparición del trombo (Figura I-6) (Cesarman-Maus *et al* 2005).

1.2.2 Rutas de señalización en plaquetas

La mayoría de los agonistas plaquetarios estimulan receptores de superficie celular denominados receptores acoplados a proteínas G o GPCR (de *G-Protein Couple Receptors*). En la cara citoplasmática de la membrana, estos receptores interaccionan con proteínas G heterotriméricas, las cuales están formadas por una subunidad α , de unión a GTP, y un heterodímero $\beta\gamma$ (Offermanns 2000). De forma similar a las pequeñas GTPasas, como Ras o Rap1, las proteínas G se encuentran en estado inactivo cuando el GDP está unido a la subunidad α . Cuando un agonista se une a su receptor, el receptor promueve el reemplazo del GDP por GTP, de forma que la proteína G se activa. La interacción del receptor con la proteína G tiene una duración limitada volviendo la proteína G a sus estados de inactividad por fosforilaciones y, en algunos casos, por endocitosis del receptor acoplado a la proteína G.

Las diferentes funciones de las proteínas G vienen determinadas por los distintos tipos de subunidades α que existen (Figura I-7). Así, los GPCR que contienen la subunidad α de tipo q, provocan la activación de la fosfolipasa $C\beta$ (PLC β), con la consiguiente hidrólisis de fosfoinosítidos. Un ejemplo de estos receptores serían los receptores de trombina (Offermanns *et al* 1997). Los GPCR que contienen la subunidad α de tipo i, inhiben la producción de AMPc (Yang *et al* 2002) y también la estimulación de la fosfatidil inositol 3 kinasa (PI3K) y la PLC β , como por ejemplo los receptores de ADP (Offermanns *et al* 1997). Los GPCR que contienen subunidades α de tipo 12/13, como el receptor de TXA₂, estimulan rutas de señalización que regulan los cambios de forma de las plaquetas a través de Rho (Moers *et al* 2003). Finalmente,

los GPCR que contienen subunidades α de tipo s, como el receptor de PGI_2 , median la estimulación de la adenilato ciclasa provocando un incremento del AMPc intracelular (Gorman *et al* 1977; Li *et al* 2010).

Los agonistas plaquetarios se pueden clasificar en dos grupos:

- **Agonistas fuertes (trombina, colágeno):** estimulan la hidrólisis de fosfoinosítidos y son poco sensibles a inhibidores de ciclooxigenasas como la aspirina.
- **Agonistas débiles (ADP, epinefrina):** Dependen de los tromboxanos para llevar a cabo sus efectos y prácticamente no producen hidrólisis de fosfoinosítidos.

Después de la activación plaquetaria por el agonista, se produce una señalización intracelular necesaria para la reorganización del citoesqueleto, exposición del receptor del fibrinógeno y secreción de gránulos, todas ellas funciones donde Rap1 juega un papel central. Hay dos vías importantes en la activación de las plaquetas:

- **Hidrólisis de fosfoinosítidos:** la vía comienza cuando la $\text{PLC}\beta$ rompe el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) para formar el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). Ambos actúan como segundos mensajeros, esenciales en la activación de Rap1 (Figura I-7).
- **Ruta de los eicosanoides:** comienza cuando la fosfolipasa A_2 citosólica (cPLA_2) libera el ácido araquidónico de la membrana plasmática para formar TXA_2 , que tras su liberación participa también en la activación de Rap1, a través de su interacción con receptores específicos (Figura I-7).

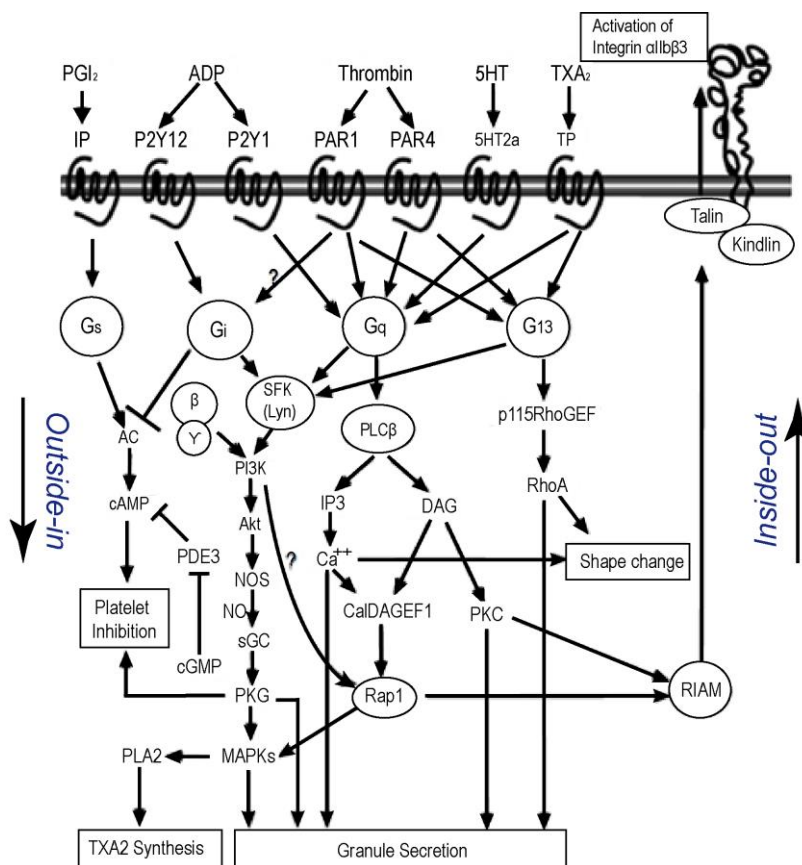


Figura I-7. Esquema de las principales rutas de señalización plaquetarias donde participa Rap1. En el esquema están representadas las principales rutas de señalización activadas por los agonistas plaquetarios más importantes como ADP, trombina y TXA_2 (señalización *outside-in*), las cuales convergen en la activación de Rap1. También se indica la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ por Rap1 en un tipo de señalización *inside-out* (Li *et al* 2010).

1.2.2.1 Agonistas plaquetarios y sus receptores

a. Trombina

La trombina es el activador más potente de las plaquetas. En ensayos *in vitro*, bajas concentraciones de trombina causan la hidrólisis de fosfoinosítidos, formación de TXA_2 , fosforilación de proteínas, aumento del calcio citosólico libre, cambio de la forma de la plaqueta, agregación y secreción de gránulos (Rittenhouse-Simmons 1979; Offermanns 2000).

Los receptores de trombina se conocen como Receptor Activador de Proteasas (PAR por *Protease Activator Receptor*). El principal receptor en humanos es PAR-1, que se puede activar

a bajas concentraciones de trombina, aunque también se expresa PAR-4 que refuerza la acción de PAR1 a concentraciones mayores (Vu *et al* 1991; Brass *et al* 1992; Coughlin 2000). En ratón el principal receptor es PAR-4, estando su actividad modulada por el cofactor PAR-3 (Kahn *et al* 1998; Nakanishi-Matsui *et al* 2000). Los receptores de trombina se activan por rotura de éstos en un sitio específico quedando expuesto un nuevo residuo amino terminal que interacciona con el segundo bucle extracelular del receptor (Vu *et al* 1991). Esta interacción provoca la activación de una proteína G acoplada al receptor desencadenando los procesos de señalización intracelular. Entre estos procesos de señalización se encuentra la activación de la enzima PLC. Las plaquetas contienen formas β y γ de esta enzima. La forma β se activa por GPCR acoplados a proteínas Gq mientras que las γ , entre las que predomina la $\gamma 2$, están reguladas por receptores tirosina quinasa (Cockcroft *et al* 1992; Berridge 1993). En el caso de activación por trombina, la PLC que actúa es la forma β . Una vez activada, PLC β hidroliza PIP2 generando DAG e IP3 (Figuras I-7, I-8) (Lapetina *et al* 1981; Rittenhouse *et al* 1985). El DAG activa la proteína quinasa C (PKC) que fosforila pleckstrina, una proteína esencial para la secreción de gránulos (Lian *et al* 2009). El IP3 se une a receptores en el sistema de túbulos densos y libera el calcio citosólico que se encuentra almacenado allí (Kaibuchi *et al* 1983; Brass *et al* 1985).

Por tanto, uno de los efectos que desencadena la trombina es el incremento del calcio citosólico libre. El calcio sirve como segundo mensajero intracelular afectando a la actividad de enzimas y a las interacciones proteína-proteína. El aumento de calcio citosólico libre se produce por la combinación de dos procesos: la liberación de calcio del sistema tubular denso, ya mencionado, y el flujo de iones de calcio extracelular a través de la membrana plasmática, desencadenado por la unión del ATP secretado a P2X, un canal iónico que actúa como receptor purinérgico. (Varga-Szabo *et al* 2009). El aumento de calcio citosólico libre es esencial para la estimulación de numerosas enzimas que contribuyen al proceso de activación plaquetaria.

b. Colágeno

El colágeno es un importante iniciador de la respuesta plaquetaria. Sirve tanto de sustrato para la adhesión plaquetaria, como de potente agonista. La interacción entre las plaquetas y el colágeno es compleja. La respuesta al colágeno viene acompañada de la hidrólisis de fosfoinosítidos, formación de TXA₂, fosforilación de proteínas y aumento de calcio citosólico libre (Clemetson *et al* 2001). Al igual que ocurre con la trombina, los inhibidores de ciclooxigenasas retardan, pero no eliminan la respuesta de las plaquetas al colágeno, sugiriendo que la formación de TXA₂ no es esencial para esta respuesta.

Las plaquetas poseen dos tipos de receptores para el colágeno (Clemetson *et al* 2001):

Glicoproteína $\alpha 2\beta 1$. Es un miembro de la familia de las integrinas y sirve de anclaje de las plaquetas al colágeno (Holtkotter *et al* 2002).

Glicoproteína VI (GPVI). Es el receptor primario del colágeno cuando éste actúa como agonista y es el responsable de la respuesta de agregación y secreción (Poole *et al* 1997; Holtkotter *et al* 2002).

c. ADP

El adenosin difosfato (ADP) es un agonista plaquetario que se almacena en los gránulos densos de las plaquetas. Cuando las plaquetas se activan por TXA₂ o por trombina a bajas concentraciones, se libera ADP, el cual interacciona con dos receptores purinérgicos acoplados a proteínas G, P2Y₁ y P2Y₁₂ (Figuras I-7, I-8) (Kunapuli *et al* 2003).

Receptores de ADP:

- **Receptor P2Y₁:** este receptor está acoplado a la proteína G_{aq} y es responsable de la activación de la PLC β provocando la hidrólisis de fosoinositidos y la movilización de calcio intracelular, dando lugar a un rápido cambio en la morfología de las plaquetas. Además, el calcio activa a la proteína CalDAG-GEFI, el principal activador de Rap1 en plaquetas (Crittenden *et al* 2004). Este receptor también puede activar proteínas G de bajo peso molecular como RhoA que también intervienen en los cambios morfológicos. Este receptor es importante para la agregación plaquetaria y generación de TXA₂. También se sabe que a través de este receptor se produce la activación de la proteína p38 MAPK en humanos, aunque no está muy estudiado (Dangelmaier *et al* 2000; Gachet 2001).

- **Receptor P2Y₁₂:** este receptor está acoplado a proteínas G_{qi2} y es también responsable de la agregación plaquetaria y la generación de TXA₂. Además, potencia la liberación de gránulos densos y la actividad procoagulante de las plaquetas (Jin *et al* 2002). Este receptor también es importante en la estabilización de los agregados plaquetarios (Cattaneo *et al* 1990). La activación de este receptor conlleva la activación de Rap1b a través de PI3K (Figura I-8) (Woulfe *et al* 2002).

Mechanisms of Rap1 activation in platelets

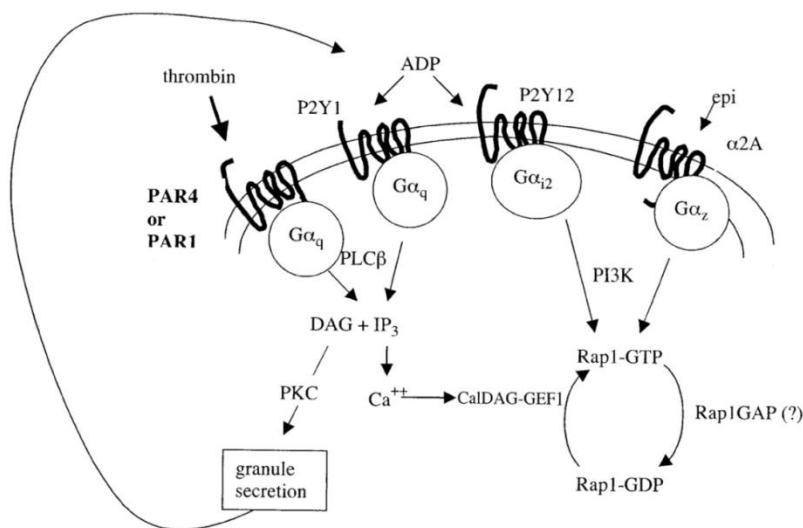


Figura I-8. Esquema de las principales rutas de señalización plaquetarias, a partir de receptores acoplados a proteínas G, que activan a Rap1. En el esquema están representadas las principales rutas de señalización activadas por los agonistas plaquetarios más importantes como ADP, epinefrina (epi) y trombina. La activación de Rap1 depende tanto del incremento de calcio intracelular, a través de la activación de CalDAG-GEFI, como de la activación de PI3K a partir del receptor P2Y12. Figura adaptada de (Woulfe *et al* 2002).

d. Tromboxano A₂

El TXA₂ se forma a partir del ácido araquidónico por la ruta de la ciclooxigenasa. Una vez formado, el TXA₂ puede difundir a través de la membrana plasmática y activar a otras plaquetas a través de los receptores de TXA₂, también llamados PGH2 (*Prostaglandin H₂ Receptor*). Se trata de GPCR acoplados a proteínas G de tipo Gq, Gi, o G12/13, que activan PLCβ o PLA₂ (Hirata *et al* 1991).

El TXA₂ y el ADP amplifican la señal inicial. Este proceso es efectivo localmente y está limitado por la corta vida de los tromboxanos. Esto permite confinar la activación de las plaquetas al área del daño original (Siess *et al* 1983).

1.2.2.2 Inhibidores plaquetarios: PGI₂ y óxido nítrico

Existen una serie de controles internos y externos que regulan las respuestas plaquetarias exacerbadas, y sin los cuales se producirían síndromes trombóticos como el infarto de miocardio. Estos controles incluyen una fina regulación de la concentración del Ca²⁺ intracelular, fosfatasa intracelulares que limitan la señalización a través de rutas dependientes de kinasa, ADPasas intracelulares que hidrolizan el ADP y, finalmente, el efecto inhibitorio de la

prostaglandina PGI₂ (o prostaciclina) y el óxido nítrico (NO), los cuales actúan modulando los niveles de nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc respectivamente (Smolenski 2012).

La prostaglandina PGI₂ es liberada al medio por células del endotelio activado y provoca en las plaquetas el aumento de los niveles de AMPc a través de la estimulación de receptores acoplados a la adenilato ciclasa a través de proteínas Gs (Gorman *et al* 1977). Los efectos del AMPc están mediados por kinasas dependientes de AMPc, como la proteína kinasa A (PKA) (Schwarz *et al* 2001). Algunos de los sustratos de esta enzima son la glicoproteína 1β (Fox *et al* 1989), la proteína de unión a actina (Chen *et al* 1989), la cadena ligera de la miosina (Hathaway *et al* 1981), VASP (*Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein*) (Butt *et al* 1994), CalDAG-GEFI y Rap1b (Subramanian *et al* 2013; Benz *et al* 2016). El aumento de AMPc provoca cambios en la función plaquetaria, como la inhibición de la hidrólisis de fosfoinosítidos, una disminución de calcio citosólico libre en respuesta a agonistas y un mayor secuestro del calcio por el sistema tubular. El resultado es la inhibición de la activación (Geiger *et al* 1994).

El óxido nítrico (NO) es otro potente inhibidor plaquetario sintetizado por la encima óxido nítrico sintasa y secretado por las células endoteliales, entre otros tejidos (Pollock *et al* 1991; Nathan 1992), aunque también se ha visto que las plaquetas son capaces de sintetizar una pequeña parte para autorregularse (Zhou *et al* 1995). El NO provoca el incremento en los niveles de GMPc por activación de la guanilato ciclasa, inhibiendo así la agregación plaquetaria (Murad *et al* 1978; Warner 1996; Bellamy *et al* 2002).

1.2.2.3 La GTPasa Rap1 en plaquetas. Regulación por proteínas GEF y GAP

Rap1 es una pequeña GTPasa de la familia Ras que se expresa ubicuamente (Bos, 1998). La expresión de la isoforma Rap1b es muy elevada en plaquetas y en megacariocitos maduros, constituyendo el 0,1% del total de las proteínas (Figura I-9) (Torti *et al* 1994; Stork *et al* 2005). Al igual que todas las GTPasas, las proteínas Rap se activan mediante la unión de GTP, reacción catalizada por los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) como C3G, el primer RapGEF identificado (Stork *et al* 2005), (ver Figura I-1).

Trabajos anteriores han identificado proteínas activadoras de Rap1b (RapGEF) que son importantes en la función plaquetaria, como CalDAG-GEFI en ratón (Crittenden *et al* 2004) y CalDAG-GEFIII y PDZ-GEF1 en humanos (Schultess *et al* 2005) (Figura I-9).

CalDAG-GEFI (también conocido como RasGRP2), es el principal GEF de Rap1b tanto en plaquetas como en megacariocitos y es responsable de la rápida activación de Rap1b, en respuesta a agonistas que producen una elevación del calcio intracelular (Stefanini *et al* 2009).

Al igual que otros GEF de la familia Ras, CalDAG-GEFI posee un dominio catalítico de tipo REM-CDC25, localizado en su extremo N-terminal. Además, posee una región reguladora C-terminal con dos dominios EF, de unión a Ca^{2+} , y un dominio C1 de unión a DAG (Ebinu *et al* 1998; Stefanini *et al* 2017). La activación de Rap1b por parte de este GEF está mediada por la unión de Ca^{2+} a los motivos EF de CalDAG-GEFI (Stefanini *et al* 2010). Se ha demostrado que PKA es un importante regulador negativo del eje CalDAG-GEFI-Rap1b. Por una parte, PKA fosforila e inhibe a CalDAG-GEFI; además, PKA también fosforila a Rap1b induciendo su translocación desde la membrana al citosol y por tanto, separándola de la integrina. Por otra parte, PKA controla los niveles de calcio intracelular, induciendo su exportación desde el citosol hacia el exterior. Finalmente, PKA fosforila y activa a Rap1GAP2, favoreciendo la inactivación de Rap1 (Guidetti *et al* 2013; Subramanian *et al* 2013; Stefanini *et al* 2017).

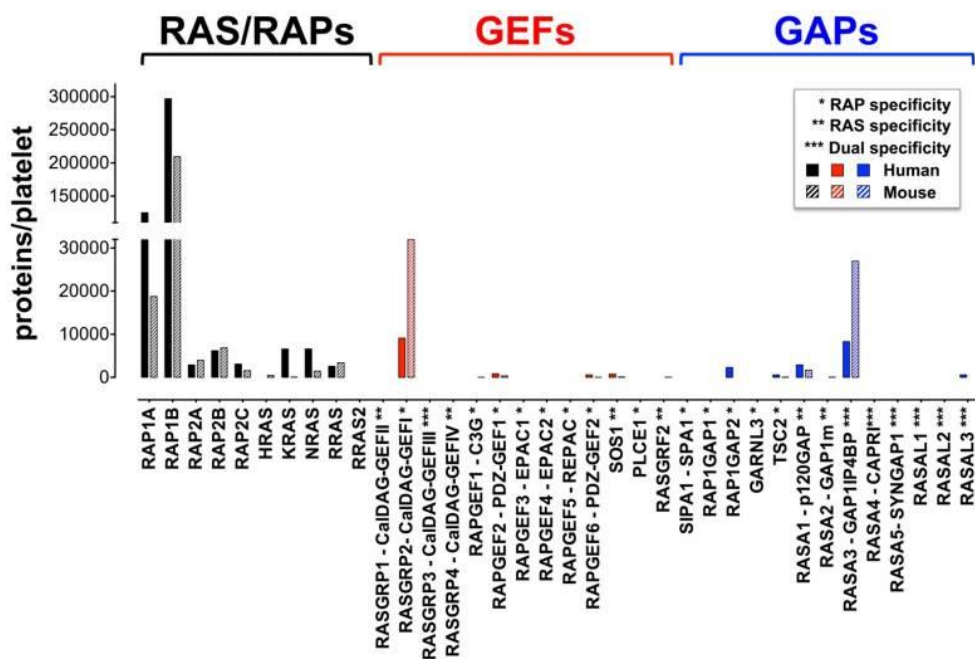


Figura I-9: Expresión de proteínas RAS/RAP, GEF y GAP en plaquetas. La estimación de los niveles de expresión de las proteínas se basa en estudios de análisis proteómico cuantitativo de plaquetas humanas (Burkhart *et al* 2012) (barra sólida) y de ratón (Zeiler *et al* 2014) (barras con trama). Tomado de (Stefanini *et al* 2016).

El GAP de Rap1b más abundante en plaquetas es RASA3 (Figura I-9). RASA3 pertenece a la familia GAP1, caracterizada por la presencia de un dominio GAP en el extremo N-terminal flanqueado por dos dominios C2 en tándem. En el extremo C-terminal presentan un dominio PH, de homología a pleckstrina, unido a un motivo Btk de 26 aminoácidos (PH/Btk) (Yarwood *et al* 2006). El grupo de W. Bergmeier ha propuesto la existencia de un balance entre

CalDAG-GEFI y RASA3, de forma que cuando las plaquetas están en estado quiescente RASA3 está activo en la membrana plasmática limitando la actividad de Rap1b. Cuando la plaqueta es activada por agonistas relacionados con receptores acoplados a proteínas G, se activaría CalDAG-GEFI activando así a Rap1b a través de una vía principal. Por otro lado, la señalización intracelular promovida por la activación plaquetaria provocaría la liberación de ADP, el cual, a través de sus receptores como el P2Y12 activaría PI3K que inhibiría a RASA3 permitiendo la activación de Rap1b (Figura I-10) (Stefanini *et al* 2015).

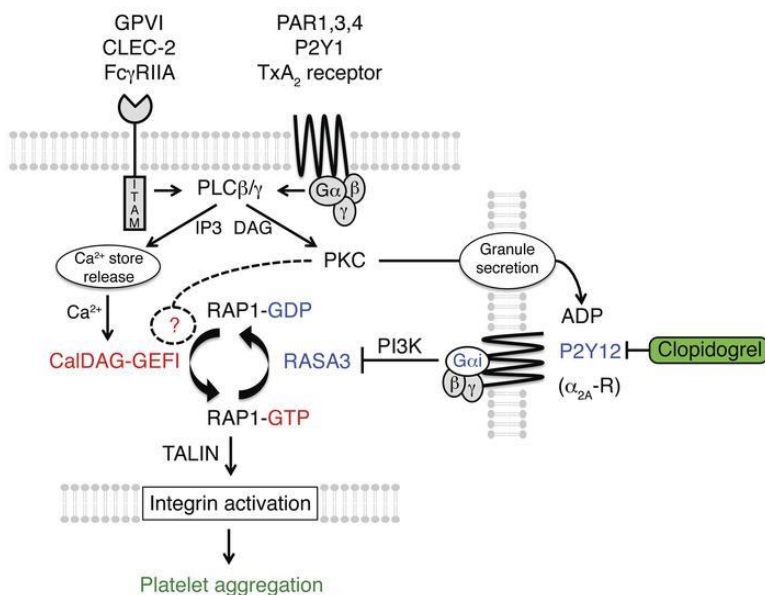


Figura I-10: Esquema de la regulación de Rap1 en plaquetas. Rap1 está regulado por el balance de actividad CalDAG-GEFI y RASA3. Este esquema muestra cómo la activación de la plaqueta a través de receptores ITAM o receptores acoplados a proteínas G llevaría a la activación de Rap1 a través de CalDAG-GEFI como vía principal. También se muestra la activación de RASA3, la cual está regulada por activación del receptor de ADP P2Y12 a través de PI3K (Stefanini *et al* 2015).

Otra proteína involucrada en la regulación de la actividad de Rap1b en plaquetas es VASP, una proteína que pertenece a la familia Ena/VASP y es importante en la regulación de la dinámica del citoesqueleto. Las plaquetas de ratones *knock out* para VASP muestran una reducción en la activación de Rap1b, pero una mayor adhesión al endotelio (Aszodi *et al* 1999; Benz *et al* 2016). VASP interacciona directamente con el dominio SH3 N-terminal de CrkL. Esta interacción está regulada negativamente por PKA. CrkL a su vez interacciona con C3G formando un complejo ternario VASP-CrkL-C3G que regula la actividad de Rap1 (Benz *et al* 2016).

1.2.2.4 Rap1 es una molécula clave en la función plaquetaria

Muchos estudios apoyan un papel de la isoforma Rap1b en aspectos críticos de la función plaquetaria, incluidos agregación, coagulación adhesión y extensión, a través de la integrina plaquetaria $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (Shattil *et al* 1998; de Bruyn *et al* 2003; Stork *et al* 2005). Experimentos *in vivo* con un modelo de ratón *knock out* para Rap1b han demostrado que esta GTPasa participa en las respuestas desencadenadas por la mayoría de agonistas plaquetarios, incluyendo ADP, colágeno, epinefrina, trombina y PMA (Chrzanowska-Wodnicka *et al* 2005) (Figura I-7). En particular, ADP, trombina y PMA (Rosado *et al* 2000; Harper *et al* 2010a) activan a Rap1b a través de rutas que implican un incremento en el calcio intracelular, vía activación de PLC mediada por GPCR acoplados a proteínas G tipo q2. Rap1b también puede ser activada a través de mecanismos independientes de Ca^{2+} que involucran señalización a través de Gai/Gaz y la subsiguiente activación de PI3K (Lova *et al* 2002; Woulfe *et al* 2002; Jung *et al* 2006) (Figura I-8).

La proteína Rap1b es rápidamente activada tras la estimulación de plaquetas con trombina, de forma que, en condiciones de no agregación, los niveles de Rap1GTP se representan como un pico de activación que se alcanza en poco tiempo tras el estímulo y que se mantiene a lo largo del tiempo. En cambio, en condiciones de agregación, Rap1b sufre una drástica inhibición como consecuencia de su translocación desde la membrana plasmática a la fracción del citoesqueleto (Figura I-11 A) (Franke *et al* 2000). La PLC media el incremento en el Ca^{2+} intracelular necesario para la activación de Rap1b, lo que sugiere la participación de CalDAG-GEFI (Franke *et al* 2000; Eto *et al* 2002). Sin embargo, si bien las plaquetas de ratones *knock out* para CalDAG-GEFI muestran una fuerte inhibición de la agregación plaquetaria en presencia de la mayoría de agonistas, dicha agregación no se ve afectada en presencia de elevadas concentraciones de trombina o PMA (Figura I-12) (Crittenden *et al* 2004). Este resultado sugiere que en plaquetas deben existir rutas de activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, y por tanto de Rap1b, independientes de CalDAG-GEFI (Figura I-13).

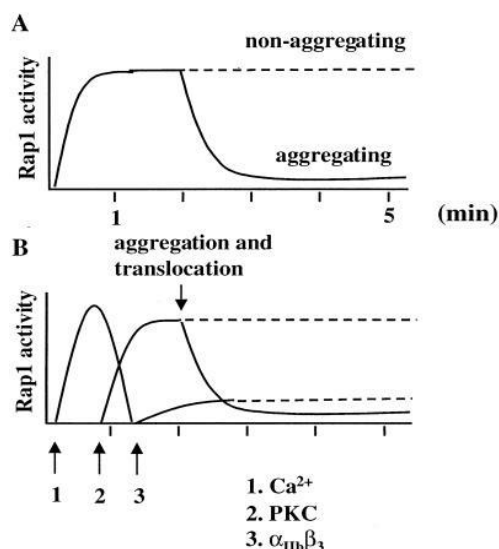


Figura I-11. Activación secuencial de Rap1. (A) Representación esquemática de la activación e inactivación de Rap1 en plaquetas estimuladas con trombina en condiciones de agregación (línea sólida), y no agregación (línea discontinua). (B) Modelo de la regulación secuencial de la actividad de Rap1 generada por Ca^{2+} , PKC e integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (Franke *et al* 2000).



Figura I-12. Las plaquetas *knock out* para CalDAG-GEFI responden a altas concentraciones de trombina y PMA. Ensayo de agregación utilizando plaquetas de ratones *knock out* para CalDAG-GEFI (líneas grises) y plaquetas de ratones silvestres (líneas negras). Las plaquetas de ratones *knock out* para CalDAG-GEFI muestran una fuerte inhibición de la agregación en respuesta a colágeno, ADP, U46619, A23187 y, en menor medida, a bajas dosis de trombina y PMA. (Crittenden *et al* 2004). Sin embargo, no se aprecian diferencias de agregación entre los dos genotipos a altas concentraciones de trombina o PMA.

Además de activar la ruta PLC-CalDAG-GEFI-Rap1, se sabe que la trombina induce un segundo pico de activación de Rap1b que está mediado por la PKC pero que es independiente de Ca^{2+} y de CalDAG-GEFI (Figura I-11 B) (Franke *et al* 2000; Cifuni *et al* 2008). Los componentes específicos de esta segunda ruta, y en particular el GEF específico que contribuye

a esta segunda ola de activación de Rap1b no han sido identificados hasta el momento (Figura I-13).

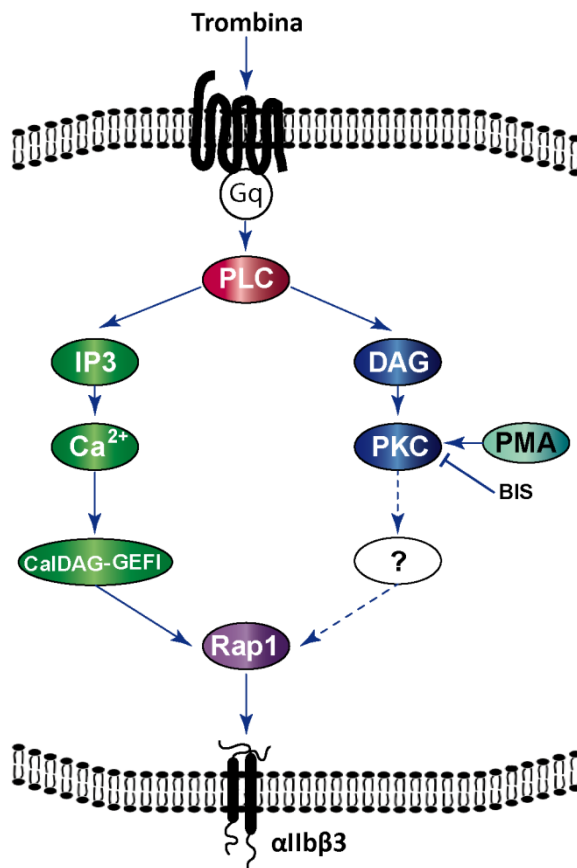


Figura I-13. Representación esquemática de las rutas de activación de Rap1 por trombina.

La trombina induce dos olas de activación de Rap1, una de ellas dependiente de Ca^{2+} y CalDAG-GEFI y una segunda ola de activación dependiente de la ruta de PKC.

1.2.2.5 Funciones de PKC en la activación plaquetaria

Las proteínas PKC (*Protein Kinase C*) son una familia de serina/treonina kinasas formada por 12 isoformas que se dividen en tres subgrupos, “convencionales”, “noveles” y “atípicas” (Nishizuka 1986, 1988; Harper *et al* 2010b). PKC se ha identificado como un receptor celular de segundos mensajeros lipídicos como el DAG y además es una enzima clave en la señalización a través de receptores acoplados a PLC. Las proteínas PKC convencionales (α , β I, β II y γ) requieren para su activación Ca^{2+} , 1,2-DAG y fosfolípidos y son receptores de ésteres de forbol como el PMA (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*), los cuales mimetizan la acción del DAG (Inoue *et al* 1977). Las PKC noveles (δ , ϵ , η , μ y θ) han perdido su propiedad de unirse a

Ca^{2+} y sólo se activan por fosfolípidos y DAG, siendo por tanto, también activadas por ésteres de forbol (Ono *et al* 1987). El tercer grupo, las PKC atípicas (ζ , $\lambda/1$) solo responden a fosfatidil serina (Nishizuka 1988; Selbie *et al* 1993). Por otra parte, se ha descrito que en plaquetas, las PKC α , PCK δ y PKC θ , pueden ser fosforiladas en residuos de tirosina por tirosina kinasas de la familia Src (Murugappan *et al* 2005; Hall *et al* 2007).

En cuanto a su función en plaquetas, PKC controla numerosas funciones como agregación, liberación del contenido granular (Murugappan *et al* 2004; Konopatskaya *et al* 2009), síntesis de TXA₂ (Harper *et al* 2010b), movilización del calcio intracelular (Rosado *et al* 2000) y regulación de la diferenciación de megacariocitos (Kostyak *et al* 2017).

Entre los sustratos de las proteínas PKC se encuentran proteínas relacionadas con la secreción de gránulos (Harper *et al* 2010a) como SNAP23, syntaxina 4 y Munc18c, y proteínas asociadas al citoesqueleto como pleckstrina, MARKS y VASP (Harper *et al* 2010b).

1.2.2.6 Función de las MAPK en plaquetas

Las MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) son kinasas de Ser/Thr que controlan la mayor parte de las respuestas intracelulares en los organismos eucariotas y contribuyen a la proliferación, migración, diferenciación y apoptosis. En mamíferos hay más de 12 genes que codifican diferentes MAPK. La familia mejor conocida es la de ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases: ERK-1 y ERK-2); normalmente activadas por factores de crecimiento. Otras MAPK son activadas fundamentalmente por citoquinas y señales de estrés, como las familias JNK (c-Jun N-terminal kinase: JNK-1, JNK-2 y JNK-3); ERK3 (ERK3, p97MAPK, ERK4); ERK7 (ERK7 y ERK8) y p38 MAPK (con 4 isoformas, α , β , γ y δ) (Pearson *et al* 2001; Raman *et al* 2007). En la señalización canónica de las MAPK, GTPasas de las familias Ras o Rho estimulan proteínas MAP kinasa kinasa kinasa (MAPKKK, como por ejemplo Raf-1 o B-Raf), las cuales activan por fosforilación en residuos de Ser/Thr a MAP kinasa kinasas (MAPKK, como MEK1/2), que a su vez activan a las MAP kinasas (MAPK) mediante una doble fosforilación en un residuo de treonina y otro de tirosina del motivo conservado Thr-X-Tyr. Las MAPK fosfatasas revierten las fosforilaciones de forma que las MAPK vuelven a su estado inactivo (Chang *et al* 2001; Dhillon *et al* 2007). Aunque algunos estudios sugieren que las MAPK no juegan un papel esencial en la función plaquetaria (Borsch-Haubold *et al* 1996; McNicol *et al* 2003), la mayoría de ellos indican que tanto ERK1/2 como p38 α MAPK y JNK están presentes en plaquetas y son activadas cuando las plaquetas son estimuladas por diferentes agonistas (Papkoff *et al* 1994; Saklatvala *et al* 1996; Bugaud *et al* 1999).

1.2.2.6.1 Activación y papel de ERK2 en plaquetas

ERK1/2 es capaz de fosforilar centenares de sustratos *in vivo*, pero su actividad está restringida al tipo celular y a su localización (Kolch 2005). Además, la compleja señalización a través de ERK1/2 está regulada tanto por retroalimentaciones positivas como negativas (Shin *et al* 2009).

En 1994 se identificaron dos tipos de MAPK en plaquetas, las ERK1 y ERK2 (Papkoff *et al* 1994). ERK2, pero no ERK1, es fosforilada en residuos de tirosina, serina y treonina y activa rutas de señalización plaquetaria en respuesta a trombina (Papkoff *et al* 1994) y otros agonistas como colágeno (Oury *et al* 2002; Roger *et al* 2004), FvW (Li *et al* 2001; Garcia *et al* 2005) y ADP (Garcia *et al* 2007). Solo una pequeña fracción de ERK1 se fosforila en respuesta a fuertes agonistas como trombina o colágeno debido a que ERK1 es minoritario en relación con ERK2 (Garcia *et al* 2007). La activación de ERK2 por elevadas concentraciones de trombina es independiente de las actividades Ser/Thr kinasa de Raf-1 y B-Raf, a pesar de la presencia de ambas kinasas en plaquetas. Sin embargo esta activación sí es dependiente de PKC y de la Thr/Tyr kinasa, MEK1/2 (Figura I-14) (Nadal-Wollbold *et al* 2002). Además, en esta ruta de activación de ERK2 por trombina está implicada la proteína tirosina kinasa Src (Shankar *et al* 2006).

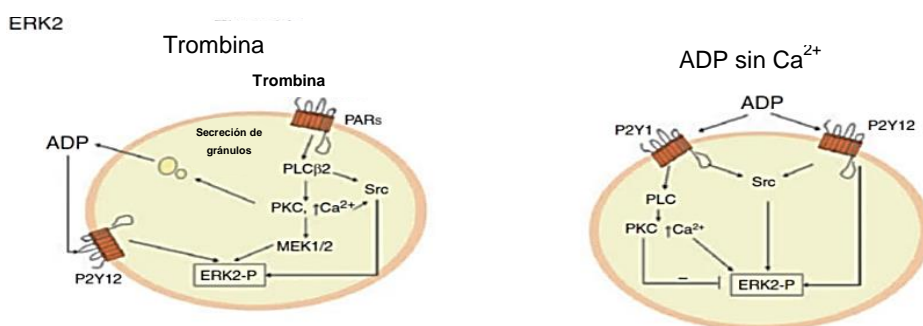


Figura I-14: Activación de la MAPK ERK2 en plaquetas. Los esquemas representan la activación de ERK2 cuando las plaquetas son activadas por trombina o ADP. Figura tomada de (Adam *et al* 2008).

En cuanto a la activación de ERK2 por ADP, se ha visto que en presencia de Ca²⁺ no hay activación y sin embargo en ausencia de Ca²⁺ ERK2 es activado por Src de manera dependiente de los receptores de ADP, P2Y12 y P2Y1 (Figura I-14) (Garcia *et al* 2007).

La integrina αIIbβ3 es la responsable de la regulación de la activación de ERK2 ya que cuando esta integrina está activada se inicia la maquinaria de defosforilación de ERK2 a través de Ser/Thr fosfatasas como PP1 y/o PP2 (Pawlowski *et al* 2002).

Recientemente se ha visto que ERK1/2 es capaz de fosforilar a CalDAG-GEFI (RasGRP2) en la serina 394, que se encuentra entre su dominio CDC25 y los *EF hands*. Esta fosforilación impediría la unión a Rap1 y por tanto su activación, de forma que ERK1/2 regularía negativamente a Rap1 (Figura I-15) (Ren *et al* 2016). Este resultado, junto con las evidencias que atribuyen a C3G un papel regulador sobre ERK1/2 en otros tipos celulares (ver Figura I-3) nos inducen a pensar en una posible relación funcional entre C3G y ERK1/2 en plaquetas.

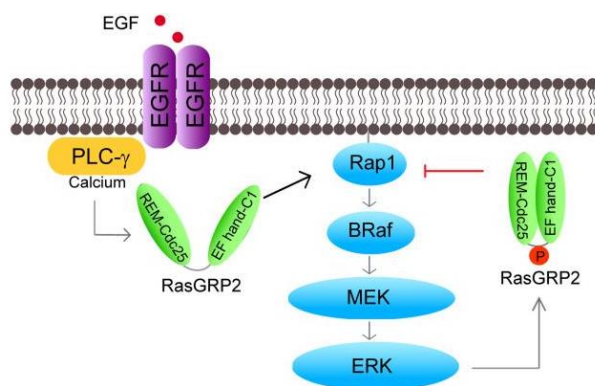


Figura I-15. Modelo de regulación negativa de CalDAG-GEFI por ERK1/2. Este modelo de regulación de ERK1/2 se ha establecido para células HEK293T, donde se ha comprobado que ERK1/2 es capaz de fosforilar a CalDAG-GEFI (RasGRP2) de forma que no pueda activar a Rap1. Se trataría de un mecanismo de retroalimentación negativo al impedir una consiguiente activación de ERK1/2. Imagen tomada de (Ren *et al* 2016).

1.2.2.6.2 p38 MAPK

En plaquetas, p38 MAPK es activada por trombina, colágeno, TXA₂, ADP y FvW (Figura I-16) (Saklatvala *et al* 1996). Durante la agregación plaquetaria, la cPLA₂ es fosforilada y activada por p38 por lo que p38 es importante en la activación de la síntesis del TXA₂ (Borsch-Haubold *et al* 1998). p38 no es esencial en el proceso de agregación plaquetaria inducido por altas concentraciones de trombina pero sí cuando la agregación es inducida por agonistas más débiles como el FvW (Kramer *et al* 1996; Kuliopulos *et al* 2004). También se ha visto que p38 es importante en el proceso de extensión plaquetaria (Mazharian *et al* 2005).

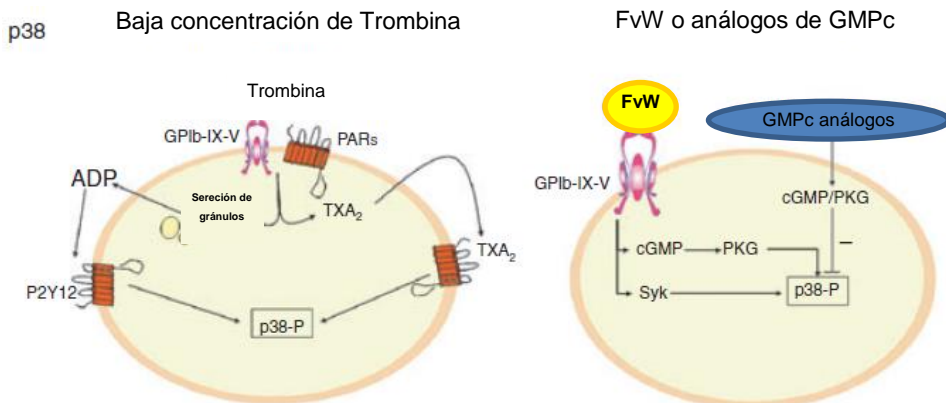


Figura I-16: Activación de la MAPK p38 en plaquetas. Los esquemas representan la activación de p38 MAPK cuando las plaquetas son activadas por agonistas como trombina, ADP, TXA₂ o factor de von Willebrand (FvW). Figura tomada de (Adam *et al* 2008). p38-P: p38 fosforilado. FvW: Factor von Willebrand.

1.2.2.6.3 Participación de MAPK en la ruta de síntesis del tromboxano

El TXA₂ se puede sintetizar en diversos tejidos, aunque las plaquetas son la fuente principal de su producción, seguidas por monocitos y macrófagos. Diferentes agonistas plaquetarios como la trombina o el ADP desencadenan una cascada de señalización en la plaqueta que conlleva a la síntesis de TXA₂. El paso inicial, y también limitante, en la síntesis de TXA₂ es la liberación de ácido araquidónico a partir de fosfolípidos de la membrana plasmática por la cPLA₂. El ácido araquidónico es rápidamente metabolizado por la ciclooxygenasa 1 (COX-1, la cual es sensible a la inhibición por aspirina), dando lugar al TXA₂ (Arita *et al* 1989).

La activación de la cPLA₂ se produce a través de diferentes vías. Se ha visto que puede ser activada por incremento en las concentraciones de calcio intracelular aunque también se ha visto que puede ser activada por PKC (Halenda *et al* 1989). La activación de cPLA₂ depende de su fosforilación en la serina 505, donde las MAPK como ERK1/2 son importantes mediadores ya que el uso de inhibidores de MEK y ERK1/2, como el U0126, bloquea la síntesis de TXA₂ (Lin *et al* 1993; Nemenoff *et al* 1993; Kramer *et al* 1995; Borsch-Haubold *et al* 1998). Se ha descrito que tirosina kinasas como Src, que participan en la activación de C3G, estarían también participando en la ruta de síntesis del TXA₂ dependiente del FvW, donde Src, mediante la fosforilación de la fosfolipasa PLCγ₂, provocaría la activación de la ruta MEK-ERK-cPLA₂ (Garcia *et al* 2005).

También se ha demostrado que la p38 MAPK desarrolla un importante papel en la regulación temprana de la cPLA₂ por fosforilación ya que se observado que la máxima activación de p38 MAPK en plaquetas estimuladas con trombina coincide con una activación

parcial de la cPLA₂ (Kramer *et al* 1996; Borsch-Haubold *et al* 1997). Inhibidores de p38 MAPK, como el SB203580, bloquean, no solo a p38 sino también a la COX1, disminuyendo por tanto la síntesis de TXA₂ (Börsch-Haubold *et al* 1998).

1.2.2.7 Shp2

Las cascadas de kinasas están reguladas por proteínas fosfatasas que revierten la fosforilación de los residuos correspondientes. Así, en plaquetas y otros tipos celulares, las MAPK ERK1/2 son reguladas por serina/treonina fosfatasas como PP2A (Chiang 1993; Pawlowski *et al* 2002; Sundaresan *et al* 2002; Moscardo *et al* 2006; Martin-Encabo *et al* 2007). Otras proteínas plaquetarias como la PLC, que sufren fosforilación en residuos de tirosina por tirosina kinasas como Src (Garcia *et al* 2005) son reguladas por desfosforilación mediada por proteínas tirosina fosfatasa (PTP, *Protein-Tyrosine Phosphatases*). Las PTP están divididas en PTP clásicas, que desfosforilan exclusivamente residuos de tirosina, o PTP duales, que además de desfosforilar residuos de tirosina, desfosforilan también residuos de serina y treonina (Tonks 2006). En plaquetas, las PTP más importantes son Shp1 y Shp2, que son exclusivamente tirosina fosfatasas.

Shp2 es una proteína citosólica que está codificada por el gen *ptpn11*. En literatura también se la conoce entre otros nombres como PTPN11 y SH-PTP2. En su estructura contiene dos dominios SH2 en el extremo amino terminal y el dominio catalítico PTP en el extremo carboxilo terminal, el cual se encuentra bloqueado en el estado inactivo por uno de esos dominios SH2 (Barford *et al* 1998; Hof *et al* 1998). Tanto Shp1 como Shp2 tienen importantes funciones en la regulación de la diferenciación de megacariocitos y de la actividad plaquetaria (Mazharian *et al* 2013). Además, se ha observado que la función de Shp2 es inhibida por fosforilación en residuos de serina y treonina por ERK1/2 en células de feocromocitoma PC12 (Peraldi *et al* 1994), por lo que no se descarta su participación en la regulación de las rutas de MAPK en plaquetas aunque este hecho no se ha demostrado.

1.3 FUNCIÓN DE LA RUTA C3G-Rap1 EN PLAQUETAS Y NEÚTRÓFILOS.

Un aspecto interesante es que, a pesar de que tanto C3G como su efector Rap1 se expresan ubicuamente, Rap1 es mucho más abundante en células especializadas como plaquetas y neutrófilos y se ha sugerido que la ruta de C3G-Rap1 podría ejercer funciones específicas en estos tipos celulares (Bos 1998). Hasta el momento no existen estudios concretos sobre la posible función de C3G en dichas células, si bien se ha descrito la

participación de C3G en la ruta de diferenciación de megacariocitos a plaquetas inducida por trombopoyetina (Stork *et al* 2005, Ortiz-Rivero 2017).

Por otra parte, análisis de microarrays realizados en nuestro laboratorio con RNA de células de LMC K562 con expresión disminuida de C3G (mediante shRNAs), han mostrado que ITGAV es uno de los genes cuya expresión está más afectada por la ausencia de C3G. ITGAV codifica para la integrina αV (CD51 o receptor de la vitronectina) un componente de las plaquetas. Además, la expresión del gen GP1BB que codifica para la glicoproteína plaquetaria Ib-beta o CD42d (receptor del factor von Willebrand) está también afectado (Figura I-16). Estos resultados sugieren un papel de C3G en la regulación de las funciones plaquetarias.

Además de su papel en plaquetas, Rap1 tiene también una importante función en la activación de los neutrófilos por productos bacterianos como fMLP, regulando la afinidad y avidéz de las integrinas a ligandos endoteliales (M'Rabet *et al* 1998). Este papel esencial de Rap1 está avalado por el descubrimiento del **síndrome de deficiencia de adhesión del leucocito (LAD-III)**, cuyos pacientes muestran infecciones bacterianas recurrentes. Este síndrome se debe a la falta de expresión del RapGEF CalDAG-GEFI, lo que provoca que los neutrófilos no se adhieran a las vénulas y no migren al sitio de inflamación (Pasvolsky *et al* 2007). Recientemente se ha demostrado que el fMLP bacteriano induce la translocación de C3G a la membrana, lo cual es esencial para la activación de Rap1 y las funciones antibacterianas de los neutrófilos dependientes de integrina $\alpha 2$ (Deevi *et al* 2010).

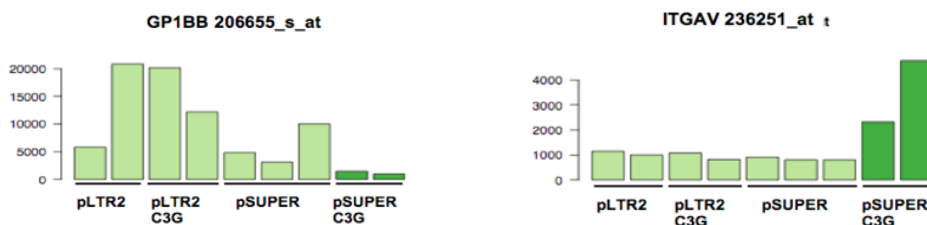


Figura I-17. La expresión de ITGAV esta incrementada en clones de K562 con expresión disminuida de C3G mediante shRNA (pSuperC3G), comparado con clones con sobreexpresión de C3G (pLTR2C3G) o clones control (pLTR2, pSuper). Por el contrario, la expresión del gen GP1BB disminuye en estos clones.

Dado que C3G es un importante GEF de Rap1 (Bos 1998) y basándonos en el papel esencial de C3G en procesos de adhesión regulados por Rap1, nuestra hipótesis de trabajo es que C3G, el cual se expresa a bajos niveles en plaquetas de ratón y humanas (Rowley *et al* 2011), puede ser un importante mediador de las funciones de Rap1 en plaquetas. Además, en este trabajo también presentamos indicios sobre un posible papel de C3G en el desarrollo de los neutrófilos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Una de las funciones principales de C3G es la regulación de la adhesión celular. Por otra parte, su principal diana, Rap1, concretamente la isoforma Rap1b, es una de las proteínas más relevantes en las rutas de señalización plaquetarias. Dado el importante papel de la adhesión plaqueta-plaqueta en la formación del coágulo, nuestra hipótesis de trabajo es que C3G podría estar implicado en las funciones de Rap1 en plaquetas. Para responder a esta hipótesis nos hemos propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar dos modelos transgénicos de ratón con expresión exclusiva en plaquetas y megacariocitos:

tgC3G, que expresan el gen humano completo.

tgC3GΔCat, que expresa un mutante deleccionado en el dominio catalítico.

Ambos transgénicos han sido previamente generados en el laboratorio.

2. Determinar si C3G tiene un papel en la función hemostática de las plaquetas, utilizando los modelos transgénicos.

3. Estudiar la función de C3G como un GEF de Rap1 en plaquetas alternativo a su GEF principal, CalDAG-GEFI.

4. Analizar la contribución de C3G en diferentes rutas de señalización plaquetaria mediante el uso de agonistas e inhibidores específicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MODELOS ANIMALES TRANSGÉNICOS UTILIZADOS

Para la realización de este estudio se han utilizado los siguientes modelos de ratones transgénicos:

- **Transgénico para C3G** (tgC3G). Expresa el gen C3G humano completo.
- **Transgénico para el mutante C3G Δ Cat** (tgC3G Δ Cat) El gen C3G humano presenta una delección en el dominio catalítico o dominio GEF).

Los ratones tgC3G y tgC3G Δ Cat fueron generados en colaboración con la Empresa GenOway (Lyon, Francia). Ambos transgenes se expresan bajo el control del promotor PF4, específico de plaquetas y megacariocitos (ver Figura A-1 en la Sección de Antecedentes del grupo en el tema de trabajo).

3.1.1 Genotipado de los ratones transgénicos por PCR

Para el genotipado de los ratones transgénicos, se homogeneizaron pequeños fragmentos de la cola de ratones de 21 días (al destete) en tampón de lisis conteniendo: Tris 100 mM pH 8,0, EDTA 5 mM pH 8,0, NaCl 200 mM y SDS 0,2 mM (0,5 ml por cada fragmento de 0,5 cm) con proteinasa K (*Proteinase K, Recombinant PCR Grade*, Roche) (100 μ l/8ml de tampón de lisis) durante toda la noche a 55°C. A partir del lisado obtenido se purificó el ADN por precipitación con NaCl 5M y etanol (protocolo basado en (Miller *et al* 1988)). La amplificación de ADN genómico fue llevada a cabo por la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) usando los siguientes oligonucleótidos:

A1: 5'-ACCACATGGCAGTCAAACCTCACAGC-3'

C1: 5'-TCTTCTGCCTTTGAGACCTGGAAGC-3'

El oligonucleótido A1 se alinea con el promotor PF4 mientras que el C1 se alinea con el segundo exón del gen C3G, amplificándose un fragmento de 847 pb (Figura A-2A, A-2B y A-4, Sección de Antecedentes del grupo en el tema de trabajo). Las condiciones de PCR fueron: 94°C, 45s, 57°C, 45s; 72°C, 80s; durante 40 ciclos.

3.2 PURIFICACIÓN DE PLAQUETAS

Para la obtención y purificación de plaquetas se han seguido diferentes protocolos en función del estudio a realizar.

3.2.1 Purificación y lisis de plaquetas para extracción de ARN

Se recogió sangre (0,5-1 ml) por sangrado retro-orbital de ratones anestesiados con ketamina/valium/atropina (ketamina 156 mg/Kg, Valium 6 mg/kg y Atropina 150 µg/kg en NaCl 0,9%), en 200-400 µl de una solución anticoagulante de ACD (*Acid Citrate-Dextrose*) (Tabla M-1). A continuación, se realizó una centrifugación a 200 g, 20 min a temperatura ambiente para obtener un plasma rico en plaquetas (PRP). El PRP se centrifugó una vez más a 3.160 g durante 10 minutos para obtener un sedimento de plaquetas. Se eliminaron los eritrocitos contaminantes mediante un breve tratamiento con oxalato amónico al 1%. Tras dos lavados adicionales con PBS, el sedimento de plaquetas fue resuspendido en tampón de lisis *RLT de Rneasy kit* (QIAGEN), y se siguió el procedimiento especificado por el comerciante para la extracción de ARN total.

Tabla M-1: Anticoagulantes utilizados para la obtención y manipulación de plaquetas de ratón. Se indica en qué ensayo se utilizaron, la composición y concentración inicial y el proveedor.

Anticoagulante	Uso	Composición/Concentración	Proveedor
Ácido Citrato-Dextrosa (ACD)	Análisis de ARN	Citrato trisódico 80 mM Ácido cítrico 52 mM Glucosa 180 mM	Elaboración en laboratorio
Heparina	Análisis de la expresión de C3G en plaquetas	35 U l/ ml sangre	Sarstedt 41.1393.005
EDTA	Evaluación de células sanguíneas Tromboembolismos	1,6 mg / ml sangre	Sarstedt 41.1395.005
Citrato	Ensayo de Rap Western Blot	0,106 mol/lit (3,2 %)	Sarstedt 41.1350.005

3.2.2 Purificación y lisis de plaquetas para extracción de proteínas

Se extrajo sangre (1 ml por ratón) por punción cardiaca del ventrículo izquierdo de ratones previamente anestesiados con Isoflurano al 2% (Vetflurane®, Virbac), utilizando jeringuillas con agujas 21G. La sangre se recolectó en tubos de citrato (Tabla M-1) y se centrifugó a 100 g, 4 minutos. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 100 g, 5 minutos, obteniendo así el PRP. Se trasvasó el PRP a un nuevo tubo y se centrifugó una vez más a 1.300 g durante 5 minutos obteniendo el sedimento de plaquetas, el cual se resuspendió en un

determinado volumen de tampón Tyrode-Hepes sin BSA (NaCl 134 mM, Na₂HPO₄ 0,34 mM, KCl 2,9 mM, NaHCO₃ 12 mM, Hepes [N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfónico], 20 mM pH 7,0, glucosa 5 mM). Para obtener los extractos proteicos las plaquetas se lisaron con el mismo volumen de tampón de lisis 2XRIPA modificado (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, NaCl 400 mM, NP-40 2%, MgCl₂ 5 mM, glicerol 2%, Na₃VO₄ 2 mM, NaF 50 mM, PMSF 2 mM, aprotinina 2 µM, leupeptina 2 µM) en hielo durante 10 minutos y posterior centrifugación a 15.000 g a 4°C para eliminar membranas.

3.2.3 Purificación de plaquetas para inmunofluorescencia y análisis de la producción de Tromboxano A₂

Se extrajo sangre (1 ml por ratón) por punción cardiaca del ventrículo izquierdo de ratones (un ratón por cada condición) previamente anestesiados con Isoflurano al 2% (Vetflurane®, Virbac), utilizando jeringuillas con agujas 21G. La sangre se recolectó en tubos de citrato (Tabla M-1) y se centrifugó a 100 g, 4 minutos. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 100 g, 5 minutos, obteniendo así el PRP. Se trasvasó el PRP a un nuevo tubo y se centrifugó una vez más a 1.300 g durante 5 minutos obteniendo el sedimento de plaquetas, el cual se resuspendió en un determinado volumen de tampón Tyrode-Hepes sin BSA para proceder a continuación con el ensayo de inmunofluorescencia (ver 3.14).

3.3 OBTENCIÓN DE MEGACARIOCITOS A PARTIR DE MÉDULA ÓSEA PARA EL ANÁLISIS DE ARN Y PROTEÍNAS.

3.3.1 Extracción de médula ósea

Para el análisis de la expresión de C3G en megacariocitos se extrajo médula ósea, en condiciones de esterilidad, a partir de los fémures y tibias de ratones de 6-8 semanas de edad, previamente anestesiados con ketamina/valium/atropina, mediante perfusión de los huesos con PBS 1X.

3.3.2 Diferenciación de megacariocitos

Para la diferenciación de los megacariocitos la médula ósea extraída se cultivó en medio RPMI suplementado con suero de caballo al 20% y en condiciones de 5% CO₂ y 33°C. Los

megacariocitos se diferenciaron por adición al medio de cultivo de 50 ng/ml de trombopoyetina (TPO, CellGenix), un estímulo de megacariopoiesis. El cultivo se mantuvo durante 7 días y transcurrido este tiempo se recogieron las células en suspensión para extraer tanto proteína como ARN siguiendo los mismos protocolos descritos para las plaquetas (apartados 3.2.1 y 3.2.2).

3.4 RT-PCR SEMICUANTITATIVA

Se sintetizó ADNc de plaquetas de ratones transgénicos y controles a partir de ARN total usando *SuperScript® II Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Para determinar la expresión de C3G, el ADNc se amplificó por PCR, utilizando los oligonucleótidos específicos de distintos exones del gen C3G humano que se indican en la Tabla M-2.

Tabla M-2. Tabla de oligonucleótidos. Se indica la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los diferentes exones de C3G, así como del gen control CD41, mediante PCR.

Exones	Oligonucleótido Directo	Oligonucleótido Reverso
Exones 3-4 C3G	5'-GCAACAGACAGATTTCTACCAG-3'	5'-CTGTGCTGAATTCGAGGATC-3'
Exones 3-5 C3G	5'-GCAACAGACAGATTTCTACCAG-3'	5'-CTTCACTCCATCCAGCACA-3'
Exones 7-9 C3G	5'-AGCAGAGCTCCCCCTGA-3'	5'-CTAGTGTTTCACAGCTTGTGTT-3'
Exones 8-9 C3G	5'-CCTCCACCAGCATTGACAC-3'	5'-CTAGTGTTTCACAGCTTGTGTT-3'
Exones 10-12 C3G	5'-ACCACTATGATCCCGACTATG-3'	5'-TCACTGCCGTCTCTGCTG-3'
Exones 15-17 C3G	5'-GATTTGGTGTTGTACTGCGAG-3'	5'-CCTGGCTGCTACCCCC-3'
Exones 22-24 C3G	5'-GGCCTGGCCGAGTACT-3'	5'-TGCTGGAAGCAGCGCATG-3'
mCD41	5'-ATGCGGGCTCTCAGCAACATTG-3'	5'-TTGCCACAGGCAACATCACGAC-3'

Como control interno de normalización se amplificó el gen murino específico de plaquetas, CD41, (ITGA2B, codifica para la subunidad αIIb de la integrina plaquetaria), mediante los oligonucleótidos indicados en la Tabla M-2.

Las condiciones para las PCR fueron: 94°C, 45s, 55°C, 45s; y 72°C, 80s durante 35 ciclos.

3.5 TIEMPO DE SANGRADO EN CORTES DE COLA

El estudio se realizó cortando un fragmento de cola de 5 mm a los animales previamente anestesiados con Isoflurano al 2%. Las colas fueron sumergidas en PBS a 37°C y se monitorizó el tiempo hasta el cese del sangrado así como la masa de sangre obtenida. Las medidas fueron tomadas en ratones de 3 semanas, al tiempo del destete, y previamente a su genotipado. Las medidas se repitieron en los mismos animales a los 6 meses de edad.

3.6 RECUENTO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

La sangre utilizada se obtuvo a partir de ratones previamente anestesiados con Isoflurano mediante punción en el seno venoso submandibular. Para el análisis se utilizaron 30 μ l de sangre de cada muestra recogida en tubos con el anticoagulante EDTA (Tabla M-1). El estudio se realizó usando un hemocitómetro Hemavet Counter HV950FS, que realiza el recuento en base a un sistema denominado *Focused Flow Technology*, patentado por la casa Drew Scientific. El sistema hace pasar las células sanguíneas en un flujo laminar por un detector, de manera similar a un citómetro de flujo.

3.7 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE C3G EN PLAQUETAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para analizar la expresión de C3G en plaquetas mediante citometría de flujo obtuvimos 50 μ l de sangre del plexo retro-orbital de ratones anestesiados utilizando capilares de cristal heparinizados (Hirschmann® Laborgerate). La sangre se depositó en tubos de heparina (Tabla M-1) en TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7,3) quedando la heparina a una concentración final de \sim 20 U/ml. La sangre heparinizada fue diluida en tampón Tyrode-Hepes con glucosa 5 mM, albúmina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*, BSA) 0,35%, y CaCl_2 1 mM. La sangre diluida se lavó por centrifugación durante 5 min a 1.300 g y se resuspendió en 1 ml del mismo tampón. 200 μ l del preparado anterior se incubaron con anticuerpo anti-CD41 marcado con FITC (Tabla M-3) en niveles de saturación (2 μ l) durante 20 minutos en oscuridad. Después de dos lavados en PBS/1% BSA/0,1% azida sódica, la sangre se fijó con 200 μ l de Leucoperm™ Reagent A (Abd Serotec), durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizó otro lavado con PBS/1% BSA y se permeabilizó la sangre con Leucoperm™ Reagent B (Abd Serotec) al tiempo que se incubaba con antisuero de conejo anti-C3G #1008 (Guerrero *et al* 1998; Guerrero *et al* 2004) durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Tras dos lavados con PBS/1% BSA, las plaquetas se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo marcado con Cy5 en niveles de saturación (Tabla M-3), durante 20 min en oscuridad y se realizaron dos lavados más. Finalmente, se resuspendieron las plaquetas en 400 μ l de PBS antes de su análisis por citometría de flujo (FACS).

Tabla M-3: Anticuerpos utilizados para ensayos de citometría de flujo. Se indica el tipo de ensayo, así como el isotipo, la diana, el proveedor, la dilución a la que se han usado y si están o no conjugados con fluorocromos.

Anticuerpos no marcados con fluorocromos						
Anticuerpo	Isotipo	Diana		Ensayo	Proveedor	Dilución
Anti-C3G #1008	Conejo	Dominio SH3b-RemCat de C3G humano		Detección de la expresión de C3G	C. Guerrero et al, 1998	1:20
Anticuerpos marcados con fluorocromos						
Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Diana	Ensayo	Proveedor	Dilución
Anti-CD41	FITC	Rata	Integrina α IIb de ratón	Detección de la expresión de C3G	BD Pharmigen (553848)	1:100
Cy5-AffinityPure IgG (H+L)	Cy5	Cabra	Conejo	Detección de la expresión de C3G (secundario)	Jackson ImmunoResearch (111-175-144)	1:125
Anti-ratón CD62P	FITC	Rata	P-selectina de ratón	Activación plaquetaria	BD Pharmigen (553744)	1:20
JON/A	PE	Rata	Integrina α IIb β 3 de ratón activada	Activación plaquetaria	Emfret Analytics (M023-2)	1:20
Fibrinógeno	Alexa Fluor 488	Humano	Integrina α IIb β 3 de activada	Activación plaquetaria	Molecular Probes (F13191)	1:30
Anti-CD41	APC	Rata	Integrina α IIb de ratón	Activación plaquetaria	eBiosciences (17-0411)	1:30
Anti-CD9	PE	Rata	Proteína tetraspanina plaquetaria	Agregación plaquetaria	BioLegend (T22.124805)	1:100
Anti-CD9	FITC	Rata	Proteína tetraspanina plaquetaria	Agregación plaquetaria	BioLegend (T22.124807)	1:100

3.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE PLAQUETAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Esta técnica se basa en la detección de la expresión de P-selectina en la superficie plaquetaria utilizando como marcador el anticuerpo *Rat anti-mouse* CD62P marcado con FITC (Tabla M-3). La P-selectina es una proteína transmembrana de los gránulos α plaquetarios. Cuando la plaqueta se activa y libera el contenido de sus gránulos, la P-selectina queda expuesta en la superficie celular, siendo, por tanto, un marcador tanto de activación como de desgranulación plaquetaria. Simultáneamente, se midió la activación de la integrina plaquetaria α IIb β 3 usando como marcador el anticuerpo *Rat anti-mouse* α IIb β 3 marcado con PE (clon JON/A), (Tabla M-3) (Bergmeier *et al* 2002), que reconoce específicamente la forma activada de esta integrina. Alternativamente se utilizó fibrinógeno marcado con Alexa Fluor® 488 (Tabla M-3) que se une de forma selectiva y con gran afinidad a la conformación activa de la integrina α IIb β 3. Como marcador plaquetario se utilizó la subunidad α IIb de la integrina plaquetaria, la cual se detectó con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD41-APC (Tabla M-3). Para la determinación de la activación de las plaquetas se utilizaron 30 μ l de sangre lavada en tampón Tyrode-Hepes (ver apartado anterior), obtenida en tubos heparinizados (Tabla M-1), la cual se

incubó, con los correspondientes anticuerpos monoclonales marcados (Tabla M-3), durante 15 min a temperatura ambiente, en presencia de distintos agonistas e inhibidores. A continuación se realizó el análisis mediante FACSCalibur o BD Accuri™ C6 Cytometer (Becton Dickinson). Los agonistas utilizados para la activación de las plaquetas se detallan en la Tabla M-4. Los inhibidores utilizados se detallan en la Tabla M-5.

Tabla M-4. Agonistas plaquetarios utilizados. Se indica el nombre de los agonistas, los receptores de plaquetas que activan, el tiempo de acción, la concentración a la que se han utilizado y el proveedor.

Agonista	Diana	Ensayo	Tiempo de acción	Concentración	Proveedor
Trombina	Receptor PAR 4	Citometría (Activación)	15 min	0,2 y 1 U/ml	Sigma
		Citometría (Agregación)	5 y 10 min	1 U/ml	
		Western Blot	1 min	1 U/ml	
		Producción TXA ₂	3,5 min	1 U/ml	
		Inmunofluorescencia	1 min	0,5 U/ml	
		Ensayo de Rap	1 min	0,2 y 1 U/ml	
Péptido GYPGKF	Receptor PAR 4	Agregometría	6 min	0,66 mM	Roche
ADP	Receptor P2Y ₁₂	Citometría (Activación)	15 min	10 µM	Sigma
		Agregometría	6 min	6,6 µM	Roche
PMA	PKC	Citometría (Activación)	15 min	2 µM	Sigma
		Western Blot	1 min	2 µM	
		Inmunofluorescencia	1 min	2 µM	
		Ensayo de Rap	5 min	0,2 µM	
		Agregometría	6 min	10 µM	
Colágeno	GPVI, GPα ₂ β ₂	Agregometría	5 min	5 µg/ml	Chrono-Log
Colágeno/Epinefrina	GPVI, GPα ₂ β ₂ /Receptor α ₂ A	Trombosis	2 min	0,12 mg/ml /2,75 mg/ml	Sigma

Tabla M-5. Inhibidores de diferentes rutas de señalización plaquetaria utilizados. Se indica el nombre del inhibidor, su diana, el tiempo de acción, la concentración a la que se han utilizado y el proveedor.

Inhibidor	Diana	Ensayo	Tiempo de acción	Concentración	Proveedor
Clopidogrel	Receptor de ADP (P2Y ₁₂)	Citometría (Activación)	5 min	100 µM	Sigma
		Citometría (Agregación)			
		Western Blot			
SB203580	P38α	Citometría (Activación)		20 µM	Calbiochem
		Citometría (Agregación)		100 µM	
		Western Blot		200 µM	
		Inmunofluorescencia		20 µM	
U0126	MEK1	Citometría (Activación)		20 µM	Selleckchem
		Citometría (Agregación)			
		Western Blot			
		Inmunofluorescencia			
Aspirina	Ciclooxigenasa	Citometría (Activación)		20 mg/ml	Sigma
		Citometría (Agregación)		2 mg/ml	
		Inmunofluorescencia		2 mg/ml	
2MeSAMP	Receptor de ADP (P2Y ₁₂)	Western Blot/Ensayo de Rap		50 µM	Santa Cruz Biotechnology
MRS2179	Receptor de ADP (P2Y ₁)	Western Blot		20 µM	Sigma
		Citometría (Activación)		100 µM	
		Citometría (Agregación)		100 µM	
Bisindolil-maleimida	PKC	Citometría (Activación)		5 µM	Calbiochem
		Western Blot/Ensayo de Rap			
		Inmunofluorescencia			
Wortmanina	PI3K	Western Blot/Ensayo de Rap		100 nM	Calbiochem
PP2	Src	Inmunofluorescencia		10 µM	Selleckchem
SHP099	Shp2	Inmunofluorescencia		20 µM	Cayman Chemical Company
		Western Blot/Ensayo de Rap			

3.9 ENSAYO DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Las medidas de agregación plaquetaria se obtuvieron a partir de dos metodologías diferentes:

3.9.1 Agregación plaquetaria mediante agregómetro.

Los ensayos de agregación plaquetaria en agregómetro han sido realizados en el Departamento de Medicina Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid en colaboración con la Dra. Consuelo González Manchón y en el Departamento de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL, en colaboración con el Dr. José R. González Porras.

Para la realización de los ensayos de agregación en agregómetro, partimos de sangre obtenida mediante punción cardíaca a partir de ratones previamente anestesiados con ketamina/valium/atropina. La sangre obtenida se recogió en ACD (Tabla M-1).

La medida de la agregación plaquetaria inducida por colágeno se realizó en un volumen final de 800 μ l de sangre diluida 1:2 con tampón HEPES (Hepes 5 mM, $MgCl_2$ 2 mM, NaH_2PO_4 0,3 mM, KCl 3 mM, NaCl 134 mM, $NaHCO_3$ 12 mM, Glucosa 0,1%, Albúmina Sérica Bovina 0,1%, pH 7,4) usando un agregómetro Chrono-Log (Haverton, USA). Las muestras fueron incubadas a 37°C en condiciones de agitación constante y transcurridos 5 minutos se añadió colágeno a 5 μ g/ml (Tabla M-4). El grado de agregación plaquetaria se definió arbitrariamente como el porcentaje del incremento de resistencia eléctrica entre los dos cables sumergidos de la sonda de electrodos.

Para llevar a cabo la agregación plaquetaria inducida por los agonistas ADP, GYPGKF y PMA (Tabla M-4), usamos un Agregómetro Multiplate (Verum Diagnostica GmbH). Se recogieron 175 μ l de sangre en tubos de ACD (Tabla M-1), que se diluyó 1:2 en solución salina al 0,9%, conteniendo $CaCl_2$ 62,5 mM, y se incubó a 37° C bajo condiciones de agitación constante. Pasados 3 minutos se añadió ADP a 6,6 μ M, PMA a 10 μ M o GYPGKF a 0,66 mM y se monitorizó la agregación plaquetaria durante 6 minutos. El aparato mide el grado de agregación plaquetaria como el incremento de impedancia generado por la unión de las plaquetas a los sensores de las cubetas Multiplate y esta medida se transformó en unidades arbitrarias de agregación.

3.9.2 Agregación plaquetaria por citometría de flujo.

Los estudios de agregación en presencia de inhibidores se realizaron mediante una novedosa técnica basada en citometría de flujo, según la publicación de (De Cuyper *et al* 2013).

Esta técnica consiste en dividir la sangre obtenida de cada ratón en dos poblaciones y marcar las plaquetas de cada población con anticuerpos anti CD9 conjugados con fluorocromos diferentes, ya que el marcador plaquetario CD9 no interviene en el proceso de agregación plaquetaria (Figura M-1A).

En este caso hemos utilizado anti-CD9 de ratón marcado con PE y anti-CD9 de ratón marcado con FITC (Tabla M-3). Una vez marcadas las poblaciones por separado, se juntan y se activan en condiciones de agregación, de forma que en el citómetro veremos tres poblaciones: una población marcada con PE, otra con FITC y una tercera población con doble marcaje (Figura M-1B). El tamaño de las tres poblaciones dependerá del grado de agregación que presenten las plaquetas.

Para este análisis se utilizaron 50 μ l de sangre, obtenida a partir del plexo retro-orbital de ratones anestesiados con ketamina/valium/atropina, que se depositó en tubos de heparina (Tabla M-1) diluida en 200 μ l de TBS. La sangre heparinizada se diluyó en tampón Tyrode-Hepes conteniendo glucosa 5 mM, BSA0, 35% y CaCl_2 1 mM. La sangre diluida se lavó por centrifugación durante 5 min a 1.300 g y se resuspendió en el mismo tampón.

A continuación, se separó la sangre lavada en dos poblaciones y cada una se incubó con su correspondiente anticuerpo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras una centrifugación de 5 min a 2.500 g para eliminar el exceso de anticuerpo, la sangre se resuspendió en tampón Tyrode-Hepes y se mezclaron ambas poblaciones. La mezcla se incubó 2 min a temperatura ambiente en presencia de inhibidores (ver Tabla M-5) y posteriormente se añadió CaCl_2 6,6 mM y trombina 1 U/ml, manteniendo la reacción en agitación a 37°C. La reacción de agregación se paró a diferentes tiempos por adición de 250 μ l de formaldehído al 0,5% en PBS 1X.

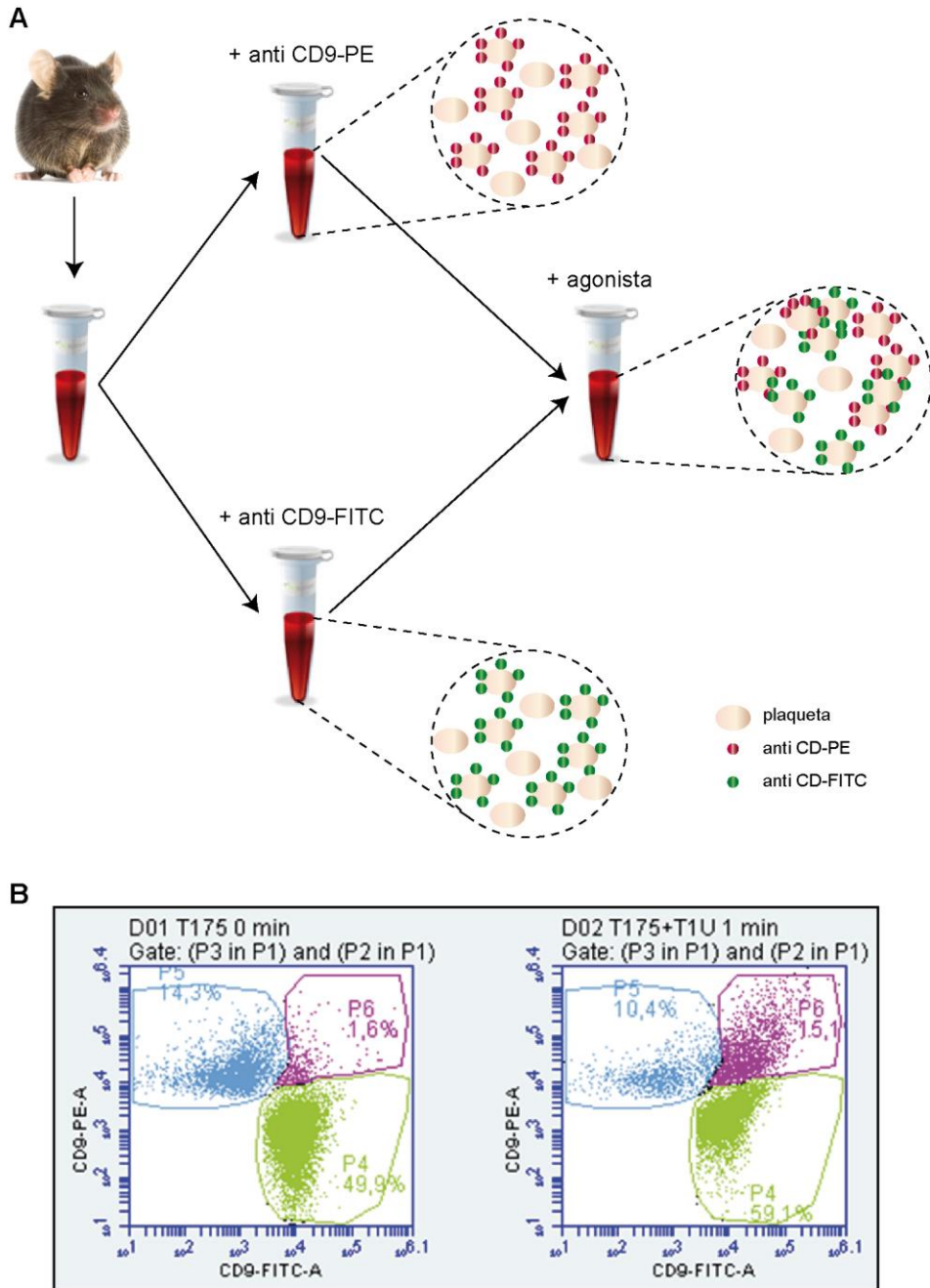


Figura M-1. Ensayo de agregación por citometría de flujo. (A) Representación esquemática del marcaje de las dos poblaciones por separado con anti-CD9 marcado con PE y anti-CD9 marcado con FITC previo a su mezcla y estimulación para la formación de agregados. (B) Paneles representativos de citometría que muestran agregados de plaquetas (población en rosa), con doble marcaje para los anticuerpos utilizados, antes de la estimulación (panel derecho) o tras estimulación con 1 U/ml de trombina durante 1 min (panel izquierdo).

3.10 INDUCCIÓN DE TROMBOSIS *IN VIVO*

Para la inducción de la trombosis *in vivo* se utilizaron ratones previamente anestesiados vía intraperitoneal con 13 μ l/g de una mezcla de suero salino con ketamina (10 mg/ml) y xilacina (1 mg/ml). La trombosis se indujo por inyección de una mezcla de colágeno y epinefrina en la vena yugular izquierda. Durante el proceso de inducción de trombosis se mantuvo a los animales sobre una placa termorregulada a 37°C para evitar que entraran en hipotermia. Se extrajeron muestras de sangre a dos tiempos, una previa a la inoculación de los agonistas y otra posterior a la inducción de la agregación, a fin de determinar la disminución en el número de plaquetas, como medida indirecta de agregación.

3.10.1 Desarrollo de la operación

Se practicó una incisión horizontal en la garganta de los ratones anestesiados, previamente lavada con etanol, dejando a la vista los vasos sanguíneos. A continuación se practicó una punción sobre la vena yugular izquierda con una aguja de 26G a través del músculo pectoral para impedir así una posible hemorragia que iniciase el proceso de coagulación de forma descontrolada. Se extrajeron entre 100 y 150 μ l de sangre que se depositaron en tubos con anticoagulante EDTA (Tabla M-1). Inmediatamente después se repitió la punción inyectando directamente en la vena yugular una cantidad equivalente a 5 μ l por gramo de peso de la mezcla de agonistas, consistente en suero salino con colágeno 0,12 mg/ml y epinefrina 2,75 μ g/ml (Tabla M-4). Transcurridos 2 minutos de la inoculación se recogió la segunda muestra de sangre.

Tras el sacrificio del animal, se recogieron los pulmones en formaldehído al 10%, con el fin de verificar la presencia de tromboembolismos pulmonares.

3.10.2 Procesamiento histológico

El procesamiento histológico de los pulmones extraídos (fijación, inclusión en parafina, tallado, seccionamiento y tinción con hematoxilina-eosina) fue realizado por el Servicio de Histopatología Molecular del IBMCC. Los cortes obtenidos fueron analizados visualmente en el microscopio óptico, cuantificando los trombos totales presentes en cada preparación de tejido como una medida semicuantitativa secundaria de la agregación.

3.10.3 Evaluación del grado de trombosis

Para evaluar el grado de trombosis se cuantificó el número de plaquetas en las muestras, antes y después de la inyección de la mezcla de colágeno-epinefrina. Se trata de una medida indirecta, basada en que cuanto mayor sea la formación de trombos, menor será el número de plaquetas en sangre circulante. La cuantificación se realizó por conteo directo de plaquetas mediante Cámara de Neubauer. Los datos se presentaron como porcentaje de agregación, calculado como el porcentaje de disminución de plaquetas respecto a la situación inicial.

3.11 WESTERN BLOT

3.11.1 Obtención de extractos proteicos

Para el análisis de la expresión proteica mediante Western Blot, se purificaron y lisaron las plaquetas o megacariocitos como se explica en el apartado 3.2.2. Previamente al lisado de plaquetas, éstas se estimularon a temperatura ambiente con 0,2-1 U/ml de trombina durante 1 minuto. En los casos donde se indique, las plaquetas fueron pretratadas con diferentes inhibidores (Tabla M-5) durante 5 minutos antes de estimular con el agonista.

Otro método utilizado para lisar las plaquetas fue la obtención directa de los extractos proteicos añadiendo al PRP tampón Laemmli 2X (Tris HCl 100 mM, pH 6,8, glicerol 20%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 2%, azul de bromofenol 0,02%, en agua Mili-Q) y posterior desnaturalización a 100°C durante 5 minutos. En este caso no se realiza cuantificación de proteína.

3.11.2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteína se realizó siguiendo el método de Bradford (Bradford 1976). Para cada determinación se hizo previamente una recta patrón con concentraciones conocidas de BSA.

3.11.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) es una técnica analítica que permite la separación de proteínas en función de su peso molecular a través del entramado

formado por la acrilamida. Las proteínas se desnaturalizan en presencia de SDS (dodecil sulfato sódico), un detergente anfipático que además confiere una densidad de carga global negativa, de forma que cuando el gel es sometido a un campo eléctrico las proteínas van a quedar separadas en función de su peso molecular.

Las proteínas obtenidas de las plaquetas lisadas se desnaturalizaron a 100°C durante 5 minutos en tampón de carga Laemmli 2X o 4X (Tris HCl 200 mM, pH 6,8, glicerol 40%, SDS 4%, β -mercaptoetanol 4%; azul de bromofenol 0,04%, en agua Mili-Q). Una vez cargadas en los pocillos del gel, la electroforesis se llevó a cabo en tampón de electroforesis SDS-PAGE 1X (Tris HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 0,2%, SDS 0,1%) a un voltaje constante de 100 V y a temperatura ambiente.

3.11.4 Transferencia de las proteínas a membrana PVDF

Las proteínas se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana PVDF (Immobilon®-P *Transfer Membrane*, Millipore) activada previamente con metanol. Para ello se empleó un sistema de transferencia húmeda utilizando como tampón amortiguador (Tris HCl 66 mM pH 8,3, glicina 386 mM, SDS 0,1%, metanol 20%) a un amperaje constante de 300 mA durante 2h a 4°C.

3.11.5 Inmunodetección de las proteínas

Una vez realizada la transferencia se incubaron las membranas en leche desnatada al 5% en tampón Tween Tris Salino (TTBS) (Tris 0,5 M, NaCl 1 M, KCl 0,05 M, Tween 20 1%; pH 8,0) (o en BSA al 2% en TTBS en el caso de detección de proteínas fosforiladas) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Después se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios, diluidos 1:1.000 en TTBS con BSA al 2%, durante 1 h en agitación constante y a temperatura ambiente (o a 4°C durante toda la noche en función del anticuerpo). Los anticuerpos primarios utilizados se detallan en la Tabla M-6. Una vez realizadas las incubaciones, las membranas se lavaron en TTBS tres veces durante 5 minutos cada vez y en agitación constante y a continuación se incubaron con el anticuerpo secundario a una dilución 1:5.000 en el caso de los anticuerpos monoclonales o 1:10.000 en el caso de los anticuerpos policlonales. Los dos tipos de anticuerpos secundarios se prepararon en una solución de leche desnatada al 5% en TTBS. Para eliminar el exceso de anticuerpos se volvieron a lavar las membranas otras tres veces en TTBS.

Tabla M-6: Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas. Se indica el isotipo, proveedor, referencia, dilución de trabajo y en qué ensayo se han utilizado, inmunofluorescencia (IF) o Western Blot (WB).

Anticuerpos primarios				
Anticuerpo	Isotipo	Proveedor	Referencia	Dilución
Anti- β -actina	Ratón	Sigma	A5451	1:1.000 (WB)
Anti-fosfo-p38 MAPK r180/Tyr182)	Conejo	Cell Signaling	9211	1:1.000 (WB)
Anti-p38 α (C20)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	Sc-535	1:1.000 (WB)
Anti-fosfo-Erk (E-4)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	Sc-7383	1:1.000 (WB)
Anti-Erk 1 (K-23)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	Sc-94	1:1.000 (WB)
Anti-Rap1 mAb	Ratón	Becton Dickinson	610196	1:1.000 (WB)
Anti-C3G (H-300)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	Sc-5359	1:1.000 (WB)
Anti-fosfo-C3G (Tyr504)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	Sc-12926	1:25 (IF)
Anti-Integrina α IIb (B10)	Humano	Santa Cruz Biotechnology	Sc-6599	1:1.000 (WB)
Anti-SH-PTP2 (B1)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	Sc-7384	1:40 (IF)
Oregon Green® 514 Faloidina	—	Thermo Scientific	O7465	1:150 (IF)
Anti-C3G #1008	Conejo	Dominio SH3b-RemCat de C3G humano	Detección de la expresión	C. Guerrero et al, 1998
Anticuerpos secundarios				
Anticuerpo	Isotipo	Proveedor	Referencia	Dilución
Anti-ratón IgG HRP	Oveja	GEHealthcare	NXA931	1:5.000 (WB)
Anti-conejo IgG HRP	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2004	1:10.000 (WB)
Anti-ratón IgG Dylight 680 nm	Cabra	Thermo Fisher	35518	1:5.000 (WB)
Anti-ratón IgG Dylight 800 nm	Cabra	Thermo Fisher	35521	1:5.000 (WB)
Anti-conejo IgG Dylight 680 nm	Cabra	Thermo Fisher	35568	1:10.000 (WB)
Anti-conejo Cy5-AffinityPure IgG (H+L)	Cabra	Jackson Immunoresearch	(111-175-144)	1:50 (IF)
Anti-ratón Cy3-AffinityPure IgG (H+L)	Cabra	Jackson Immunoresearch	(115-175-146)	1:50 (IF)
Anti-cabra Cy3-AffinityPure IgG (H+L)	Burro	Jackson Immunoresearch	(705-165-147)	1:50 (IF)

Para la detección de las proteínas por quimioluminiscencia se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP (*Horse Radish Peroxidase*) indicados en la Tabla M-5. En este caso el revelado se realizó con el kit comercial *Clarity™ Western ECL Blotting Substrates* (Bio-Rad). Para la detección por inmunofluorescencia, mediante el sistema *Odyssey Infrared Imaging* (LI-COR), se utilizaron los anticuerpos secundarios fluorescentes indicados en la Tabla M-6.

3.11.6 Cuantificación

La estimación de los niveles proteicos se determinó por densitometría con el programa ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, USA).

3.12 ENSAYO DE ACTIVACIÓN DE RAP1

Cuando una célula es estimulada se produce un reclutamiento de GEF a la membrana que facilitan la liberación del GDP de Rap1, de forma que el GTP libre en el citosol reemplaza al GDP haciendo que Rap1 adopte una conformación activa. Cuando Rap1 está en su conformación activa es capaz de unirse a efectores como la GTPasa RalGDS. El dominio RBD (*Ras Binding Domain*) de RalGDS, que comprende la región de unión a Rap1 activado, puede ser usado como ligando de afinidad para la precipitación de Rap1-GTP.

3.12.1 Purificación de la proteína de fusión GST-RalGDS-RBD

Para este ensayo se purificó la proteína de fusión GST-RalGDS-RBD que es capaz de unirse de forma específica y selectiva a la forma de Rap1B unida a GTP. Para ello, se inocularon 25 ml de un cultivo saturado de la cepa *E. coli* BL21 transfectada con el plásmido pGEX RalGDS-RBD (donación del Dr. P. Crespo, IBBTEC), que expresa la proteína de fusión GST-RalGDS-RBD, en 1 litro de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina y se incubó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm entre 0,5 y 0,7. Para iniciar la expresión de la proteína de fusión o del plásmido vacío, se añadió al cultivo 0,5 mM de IPTG (isopropil-β-D-1 tiogalactopiranosido) y se incubó durante 4 horas a 37°C. El sedimento de células se recogió por centrifugación a 6.000 g durante 20 minutos (Avanti TM J-25 Centrifuge, Beckman) y se resuspendió en 10 ml de tampón de lisis PBST (EDTA 2 mM, β-Mercaptoetanol 0,1%, PMSF 0,2 mM en PBS). Las células se lisaron por sonicación en hielo (5 minutos con pulsos de 20 segundos y 30% de amplitud en un sonicador SONICS, VibracellTM). El lisado se centrifugó a 20.000 g durante 30 minutos a 4°C para eliminar restos celulares y el sobrenadante se conservó a -80°C. La proteína de fusión se purificó mediante la adición a los sobrenadantes de resina de glutatión sefarosa (*Glutathion-Sepharose 4 fast Flow*, Amersham Bioscience), previamente lavada con PBS + PMSF (100 µl por 1 ml de sobrenadante). El glutatión presente en la resina se une específicamente a la proteína GST (glutatión-S-transferasa) de la molécula de fusión separándola del resto del lisado proteico. Tras la incubación a 4°C durante 2 horas en rotación, se lavó la resina 4 veces a 4°C con PBS frío conteniendo 1 mM de PMSF. La verificación de la expresión y purificación se realizó mediante SDS-PAGE seguido de tinción con azul de

Coomassie. La cuantificación de la proteína purificada se realizó por comparación con distintas cantidades de BSA (de 1 µg a 30 µg).

3.12.2 Ensayo de la actividad Rap1

El ensayo de actividad Rap1 se realizó utilizando volúmenes de PRP, obtenidos como se indica en el apartado 3.2.2. Estos volúmenes de PRP se repartieron de forma que por cada condición hubiese aproximadamente 2×10^7 plaquetas. Las plaquetas se estimularon a temperatura ambiente con diferentes agonistas (Tabla M-4). En los casos donde se indica, las plaquetas fueron pretratadas con inhibidores durante 5 minutos antes de la estimulación con el agonista correspondiente (Tabla M-5). Posteriormente las células se lisaron con el mismo volumen de tampón de lisis 2XRIPA modificado, manteniendo la mezcla durante 10 minutos a 4°C. La proteína de fusión GST-RalGDS RBD, purificada mediante su unión a la resina de glutatión sefarosa (ver apartado anterior), se lavó en frío (4°C) con tampón de lisis 1XRIPA modificado y se añadieron 10-20 µg de dicha proteína a cada lisado celular, incubándose la mezcla a 4°C durante 45 minutos. Tras la incubación se realizaron 3 lavados con tampón de lisis 1XRIPA modificado y el precipitado, formado por los complejos resina-GST-RalGDS-RBD-Rap1-GTP, se resuspendió en 25 µl de tampón de carga Laemmli 2X. Posteriormente se desnaturizó la proteína a 100°C durante 5 minutos. La proteína Rap1-GTP se separó por SDS-PAGE y se detectó con anticuerpos monoclonales anti Rap1 (ver Tabla M-6). La cantidad de Rap total presente en el lisado de plaquetas se determinó por Western Blot a partir de una muestra de 20 µl de lisado, tomada previamente a la obtención de los precipitados. La estimación de los niveles relativos de Rap1-GTP con respecto al Rap1 total se determinó por densitometría con el programa ImageJ.

3.13 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE NEUTRÓFILOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

El porcentaje de neutrófilos en la muestra de sangre fue determinado por citometría de flujo usando anticuerpos contra los marcadores específicos de granulocitos Ly-6G/6C (Gr1) y CD11b (Mac1) (BD Pharmingen). La sangre extraída (100-150 µl) del plexo submaxilar de ratones previamente anestesiados con Isoflurano, se recogió en tubos con anticoagulante EDTA y a continuación se incubó durante 30 min en hielo con 12 ml de Tampón de lisis de glóbulos rojos (NH_4Cl 0,155 M, KHCO_3 10 mM, EDTA 10 mM pH 7,4). Después de 10 min de centrifugación se realizó un lavado con PBS frío conteniendo 1% de suero fetal bovino (*Fetal Calf Serum*, FCS). Las células se resuspendieron en 150-200 µl de PBS/1% FCS y fueron

incubadas con exceso de los anticuerpos marcados durante 20 min a 4°C en oscuridad antes del análisis citométrico.

3.14 ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE C3G Y CO-LOCALIZACIÓN POR INMUNOFUORESCENCIA

Esta técnica se utilizó para la detección de C3G fosforilado en plaquetas, previo estímulo con trombina o PMA y en presencia o no de inhibidores de diferentes rutas (Tablas M-4 y M-5). Para ello se extrajo la sangre de 4 ratones de cada genotipo, previamente anestesiados, por punción cardíaca, tal y como se ha indicado en el apartado 3.2.3, y se depositó en tubos de citrato (Tabla M-1). La sangre se procesó como se ha descrito en el apartado 3.2.3 hasta obtener un sedimento de plaquetas que se resuspendió en tampón Tyrode-Hepes, de tal forma que quedase un volumen de 100 µl por cada condición (para cuatro o cinco condiciones). Tras pretratamiento con los inhibidores, las plaquetas se estimularon con 0,5 U/ml de trombina o PMA 2 µM durante 1 minuto a 37°C a 900 rpm en un Thermomixer C (Eppendorf). Para detener la reacción y fijar las plaquetas se añadieron 100 µl de paraformaldehído al 8% quedando a una concentración final de 4%. Transcurridos 15 minutos de fijación, se pasaron 75 µl de plaquetas ya fijadas a los cubres, previamente incubados durante toda la noche y a temperatura ambiente con poly-L-lysina hidrobromide (Sigma). Tras 50 minutos de fijación, las plaquetas se lavaron dos veces con PBS. Tras el segundo lavado se permeabilizaron con 70 µl de Tritón al 0,2% durante 5 minutos y se volvió a lavar con PBS. A continuación se dejaron las plaquetas durante toda la noche a 4°C en una solución de bloqueo (PBS con BSA al 1%). Al día siguiente se retiró la solución de bloqueo y se incubó 2h con el anticuerpo primario anti p-C3G (Tyr504)-R de conejo (ver Tabla M-6) a una concentración 1:25 en BSA al 1% y a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron los cubres con PBS y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo-Cy5 a una concentración 1:50 en BSA al 1% (Tabla M-6), durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Después se volvieron a lavar los cubres con PBS y se incubaron en oscuridad durante 20 minutos con Faloidina (Oregon Green® 514 phalloidin 300 U, Tabla M-6) a una concentración de 1:150 en BSA al 1%. Finalmente se lavaron los cubres con PBS y después con agua y se montaron sobre los portas con Mowiol 4-40 (Calbiochem). Las imágenes de fluorescencia para el estudio de la fosforilación de C3G fueron tomadas con el microscopio confocal Zeiss LSM 515 utilizando el objetivo de inmersión 100X/1,4 Oil Plan-Apochromat Ph1 y analizadas con el programa Zen 2.1. Para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las imágenes se utilizó el programa ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, USA). Para el estudio de co-localización de C3G fosforilado con Shp2 se tomaron las imágenes con el microscopio Leica SP8 utilizando el objetivo de inmersión HCXPL APO CS2 100X/1,4 y se analizaron con el programa Zen 2.1. La determinación del coeficiente de

correlación de Manders, para la cuantificación de la co-localización de las señales de fluorescencia, se llevó acabo utilizando el programa FIJI (National Institutes of Health, USA) mediante un plugin de co-localización.

3.15 ANÁLISIS DE PRODUCCIÓN DE TROMBOXANO A₂ MEDIANTE HPLC/ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

3.15.1 Obtención de las muestras

Para la determinación de la producción de TXA₂ se obtuvo la sangre por punción cardiaca y se concentraron las plaquetas como ya se ha descrito anteriormente en el apartado 3.2.3. A continuación, se estimularon las plaquetas con 1 U/ml de trombina durante 3,5 minutos a 37°C en agitación (900 rpm) en un Thermomixer C. Después se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 200 g y a 4°C. El sobrenadante obtenido se mezcló con el mismo volumen de metanol y se gasearon los tubos con nitrógeno previamente a su congelación a -80°C.

El procesado y medida de las muestras se realizó en el Instituto de Biología y Genética molecular (IBGM), Universidad de Valladolid, en colaboración con el grupo del Dr. Jesús Balsinde.

3.15.2 Procesado de las muestras

Antes de realizar las medidas se añadieron a las muestras 100 pmol de Prostaglandina E2 (PGE2) y Leucotrieno B4 (LTB4) deuterados como estándares internos. Los metabolitos lipídicos fueron extraídos usando Bond Elut Plexa en fase sólida (Agilent) como se indica en el manual del fabricante. Después de la extracción se añadió agua hasta reducir la concentración de metanol al 10% y los sobrenadantes fueron acidificados con ácido acético glacial (0,5% del volumen). Las columnas fueron homogeneizadas con 3 ml de metanol seguido de 3 ml de agua. Las uniones de metabolitos no específicas fueron eliminadas con 3 ml de metanol al 10 % y los eicosanoides fueron eluidos con 1 ml de metanol al 100%. Los metabolitos lipídicos fueron concentrados en presencia de nitrógeno gaseoso y resuspendidos en 100 µl de solvente A para su análisis por HPLC/MS/MS.

3.15.3 Condiciones experimentales del análisis por HPLC/MS/MS

Se inyectaron 80 µl del extracto de cada muestra en un cromatógrafo líquido de alta resolución (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) equipado con una bomba cuaternaria Agilent G1311C y un autocargador Agilent G1329B. Se utilizó una columna Knauer C-18 (250 x 2 mm, 5 µm de tamaño de partícula) protegida con una pre-columna C-18 (20 x 2,1 mm). El protocolo de la cromatografía fue adaptado de (Dumlao *et al* 2011). La fase móvil consistió en un gradiente de solvente A (agua/acetonitrilo/ácido acético, 70:30; 0,02 por volumen) y un solvente B (acetonitrilo/isopropanol, 50:50 por volumen). El gradiente comenzó con el solvente A al 100% y fue disminuyendo linealmente al 75% a los 3 minutos, 55% a los 11 minutos, al 40% a los 13 minutos, al 25% a los 18 minutos y al 10% a los 18,5 minutos. La última mezcla de solvente fue retenida durante 1,5 minutos adicionales y finalmente la columna fue reequilibrada con 100% de solvente A durante 9 minutos antes de inyectar la siguiente muestra.

La cuantificación se llevó a cabo por la integración de los picos cromatográficos, comparando con una curva de calibración externa hecha con los standards a través del software Analyst 1.5.2 (Sciex).

3.15.4 Análisis de los resultados

Los resultados se representan como contenido total de tromboxano encontrado en los sobrenadantes en relación con el número de plaquetas. El TXA₂ fue detectado como su forma estable tromboxano B₂.

3.16 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se han representado como la media ± SEM (error estándar de la media). Se utilizó la prueba t de Student para datos desapareados, ya que las comparaciones se realizaron entre dos grupos experimentales. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.

3.17 CONSIDERACIONES ÉTICAS.

Para la manipulación de los animales transgénicos que se han utilizado en este trabajo se han empleado los procedimientos normalizados (PNTs) aprobados por el **Servicio de Experimentación animal de la Universidad de Salamanca (OMG)**. Estos son:

PNSEA#1: Extracción de sangre

PNSEA#2: Anestesia en roedores

PNSEA#4: Eutanasia en roedores

La manipulación de los ratones se ha realizado en conformidad con las directrices de la **Unión Europea para el cuidado y bienestar animal (Directiva Europea 2010/63/UE adoptada por el Parlamento Europeo y el Consejo de la UE el 22 de Septiembre de 2010)**; y las directrices españolas incluidas en la ley 32/2007 y RD 53/2013 sobre el cuidado, experimentación y sacrificio de los animales, y la ley 9/2003 sobre organismos modificados genéticamente.

Instalaciones: Todas las líneas de ratón descritas se encuentran alojadas en el **Servicio de Experimentación animal (OMG) de la Universidad de Salamanca**.

Autorizaciones: Los estudios descritos han sido aprobados por el **Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca y por la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León**.

ANTECEDENTES
EN EL GRUPO DE
TRABAJO

4 ANTECEDENTES DEL GRUPO EN EL TEMA DE TRABAJO.

Para la realización de este trabajo hemos partido de dos líneas de ratones transgénicos para C3G y un mutante deleccionado en el dominio catalítico (C3GΔCat), desarrolladas y caracterizadas previamente en nuestro laboratorio y que se describen a continuación.

4.1 GENERACIÓN DE DOS MODELOS TRANSGÉNICOS DE RATÓN.

El gene humano C3G y el mutante C3GΔCat (que carece de los últimos 439 pb, afectando al dominio catalítico) (Guerrero *et al* 1998) fueron clonados bajo el control del promotor del gen PF4 para dirigir su expresión específicamente a megacariocitos y plaquetas. Para ello se utilizó el plásmido PF4-globina (Ravid *et al* 1991a; Ravid *et al* 1991b; Zhang *et al* 2004; Papadantonakis *et al* 2008), donde el fragmento que porta el gen de la β-globina fue sustituido por el fragmento de C3G o el mutante C3GΔCat. En ambas construcciones también se insertó el casete LoxP-PGK-Neo-LoxP para facilitar la selección de los clones. Los plásmidos resultantes fueron denominados PF4-C3G-LN y PF4-C3GΔCat-LN, respectivamente (Figura A-1), donde ambos transgenes se expresan de forma constitutiva (Figura A-2A y A-2B).

El plásmido construido también contiene secuencias consenso Kozak para asegurar una correcta iniciación de la traducción (Figura A-2A)

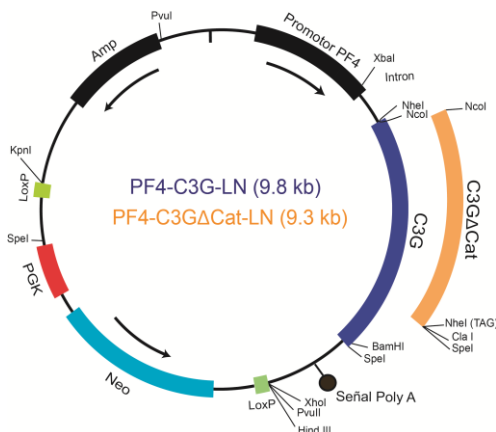


Figura A-1. Representación esquemática de los plásmidos PF4-C3G-LN (9.8Kb) y PF4-C3GΔCat-LN (9.3Kb) utilizados para generar los ratones transgénicos C3G y C3GΔCat respectivamente. Las flechas indican el sentido de la transcripción. Se muestran las enzimas de restricción más relevantes. Neo: gen de resistencia a neomicina; Amp: Gen de resistencia a ampicilina; PGK: promotor eucariota de la expresión del gen de resistencia a neomicina en células animales.

A

CAGAAGCCATTGCCTAGCCATTCACTTCAATGTTTAAATGGCAGAAAATAAATTTCCAG

A1

TCACGCATCTCTACCACATGGCAGTCAAACTCAGCAAAATCAACAGGAAGACACGGC
 AGGGTGTGGGGTCGGGCAACCGGAAGTCGGGAAGGCAACAATTTGGTACTGAAGGTG
 CATGTTCTGTAAACCGCATGGGGATAGCAGAAAATTTCTGCCACATACAGCATACCTT
 CTGCGAAAATTCAACTGTTTCTACCTCTGTAGACTGTTACATAAATTCACATTGGGG

BamHI

ACGTGGATCCTGCTGACAGCTGCTGACAGCTGGCCTCAGCTGCTTCTTTTTTTTTTTT
 TTTTTTTTTTCTCTGTTCTATGTTGCTTTAATCTTGGCTGGCCAGATCTCAAGTACT
 GTTCCACAAGTGTCATTGCTTCTGTGGATCACTTCTCATCCCTATCCGGGTTTCCG

XbaI

GACTGGGCTGGCAGTGAAGATAAAACGTGCTAGAAAGTCACAGGAGCCACTGTCTGGC
 ACTTAGAGCCCCAGACCCAGACCCAGTTTCCCCGAGGTAGCCCTTGGATCTAGCAGC

NheI **NcoI**

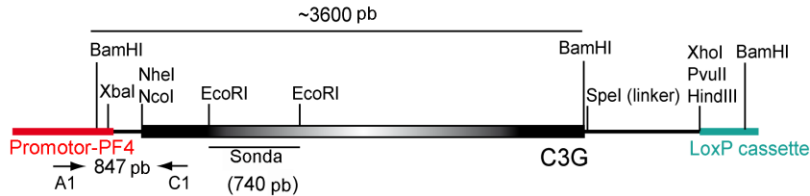
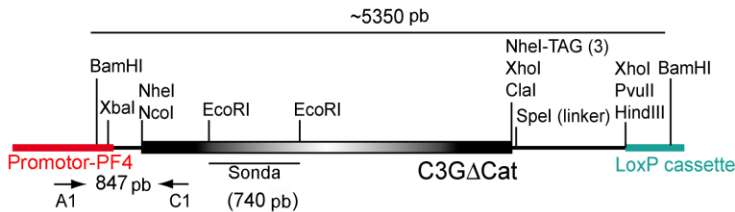
ACCTCTTGACTGTCTGGCACTTAGAGCCAATTCGAGCTGCTAGCACCATGGCCGGC

Kozak

AAGATCGAGAAAGCAGACTCTCAGCGTTCTCATCTCTTCTTCCATCAGAGCTGAT
 GGACAAATTCCACTCACCCAAATCAAGAGAACGCCATCAAGAAGGGAAACAGCTG
 AGGTGTCGTAAAGATTCCAGAGAACCTGTGAACAAAGAGGCAACAGACAGATTTCTA
 CCAGAGGGCTACCTCTCCCTTGGATCTGGAGCAGCAGGCAGTAGAATTTATGTCCAC

C1

CAGTGCTGTGGCTTCCAGGTCTCAAGGCAGAAACCTGAGCTGGCTGGAGGAGAAAG
 AGAAGGAAGTTGTAGTGCCTGCGCTACTTTAAGACCATTTGTGGACAAAATGGCAATT

PF4-C3G-LN**PF4-C3GΔCat-LN****Figura A-2: Análisis genómico de las construcciones PF4-C3G-LN y PF4-C3GΔCat-LN.** (A)

Secuencia parcial del promotor PF4 y del gen C3G que es común en los dos plásmidos construidos, PF4-C3G-LN y PF4-C3GΔCat-LN. Los oligonucleótidos A1 y C1, usados en el genotipado de los ratones, están sombreados y subrayados. Los lugares de restricción de las enzimas BamHI, XbaI, NheI y NcoI están sombreados. Los nucleótidos en cursiva corresponden a un fragmento intrónico presente en los plásmidos. La secuencia consenso Kozak está subrayada. (B) Representación esquemática lineal de los plásmidos PF4-C3G-LN y PF4-C3GΔCat-LN. Se muestran los sitios de restricción importantes, la posición de los oligonucleótidos A1 y C1 y la localización de la sonda EcoRI (740 pb) usada en el análisis por Southern blot.

Con los dos plásmidos generados se transfectaron establemente células madre embrionarias (*Embryonic Stem Cells*, ESC) y se seleccionaron clones resistentes a geneticina (Figura A-3). Dichos clones se introdujeron en blastocistos que posteriormente se implantaron

en ratonas pseudopreñadas para generar los ratones transgénicos utilizados en este trabajo (realizado por la Compañía GenOway, Lyon, Francia).

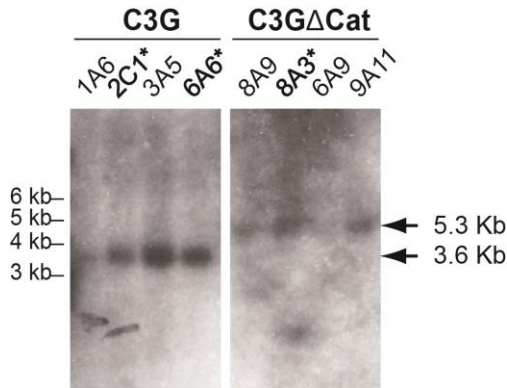


Figura A-3. Análisis de los clones transgénicos C3G y C3GΔCat mediante Southern blot del ADN genómico (20 µg) extraído de los clones indicados, C3G y C3GΔCat. Las flechas indican la posición de los fragmentos de 3,6 kb y 5,3 kb detectados con la sonda radiomarcada EcoRI. Los clones marcados con un asterisco son los que se seleccionaron para la inyección de blastocistos.

Se seleccionaron dos líneas para C3G (líneas 2C1 y 6A6) y una línea para C3GΔCat (línea 8A3), las cuales mostraron una integración correcta de los transgenes en el análisis por Southern blot (Figura A-3). La Figura A-4 representa un análisis por PCR del DNA de la cola de ratones derivados de la línea 6A6, indicando con un asterisco los positivos para el transgén C3G.

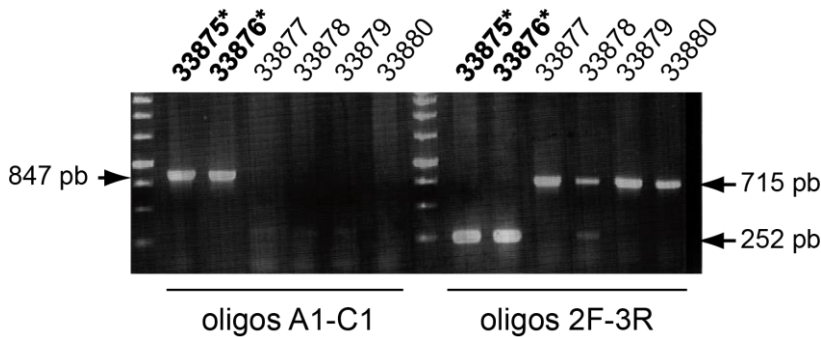


Figura A-4. Análisis por PCR de clones C3G-6A6 positivos a partir de ADN genómico extraído de los clones correspondientes. Los oligonucleótidos A1/C1 detectaron una banda de 847 pb en los clones transgénicos, mientras que el par de oligonucleótidos 2F/3R amplificó una banda de 252 pb, correspondiente a los exones 2 a 3 del transgén humano. Además, los oligonucleótidos 2F/3R amplificaron una banda de 715 pb en los controles, correspondiente al ADN genómico de ratón, que incluye el intrón 2. Los clones positivos para el transgén están marcados con asterisco.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN C3G

Como se explica en el capítulo de Antecedentes, con el fin de estudiar las funciones de C3G en plaquetas se generaron varias líneas de ratones transgénicos para C3G y el mutante C3G Δ Cat, que carece del dominio catalítico. Primeramente se comprobó la expresión de los transgenes C3G y C3G Δ Cat en las plaquetas de las líneas de ratones generadas. Para ello se realizó un estudio mediante RT-PCR semicuantitativa a partir del ARN total de plaquetas purificadas de dos ratones de cada genotipo: tgC3G, tgC3G Δ Cat y sus correspondientes controles silvestres, tal y como se describe en el apartado 3.2.1 de Materiales y Métodos. A partir del ADNc obtenido mediante una reacción de retrotranscripción (RT) se amplificaron por PCR diferentes exones de los transgenes utilizando los oligonucleótidos directo y reverso que se detallan en la Tabla M-2. Tal y como se observa en la Figura R-1A se detectó una clara sobreexpresión de C3G en las plaquetas de ratones transgénicos (línea 6A6), tanto en homocigotos como en heterocigotos para el transgén, en comparación con las plaquetas de genotipo silvestre.

También se detectó una evidente sobreexpresión (2-4 veces más) de los diferentes exones de C3G analizados en plaquetas de animales transgénicos para C3G Δ Cat, tal y como se observa en la Figura R-1B. Tal y como se esperaba, no se detectó sobreexpresión de los exones 22-24 en los tgC3G Δ Cat, ya que esos exones forman parte de la región deleccionada, perteneciente al dominio catalítico (Figura R-1B). Como controles positivos de la sobreexpresión de los transgenes se utilizó ADN, tanto de los plásmidos utilizados para la generación de las líneas transgénicas de ratón, como de células K562 con sobreexpresión del transgén C3G (Figura R-1). Como control de la integridad de las plaquetas, se amplificó el gen específico de plaquetas, CD41 (GPIIb, que codifica para la subunidad α IIb de la integrina α IIb β 3) utilizando oligonucleótidos específicos detallados en la Tabla M-2. Puesto que el promotor PF4, que dirige la expresión de los transgenes, es específico de plaquetas y megacariocitos (Ravid *et al* 1991a; Ravid *et al* 1991b), también se observó la sobreexpresión de C3G en megacariocitos diferenciados con TPO obtenidos a partir de médula de la línea transgénica C3G-2C1 (Figura R-1C).

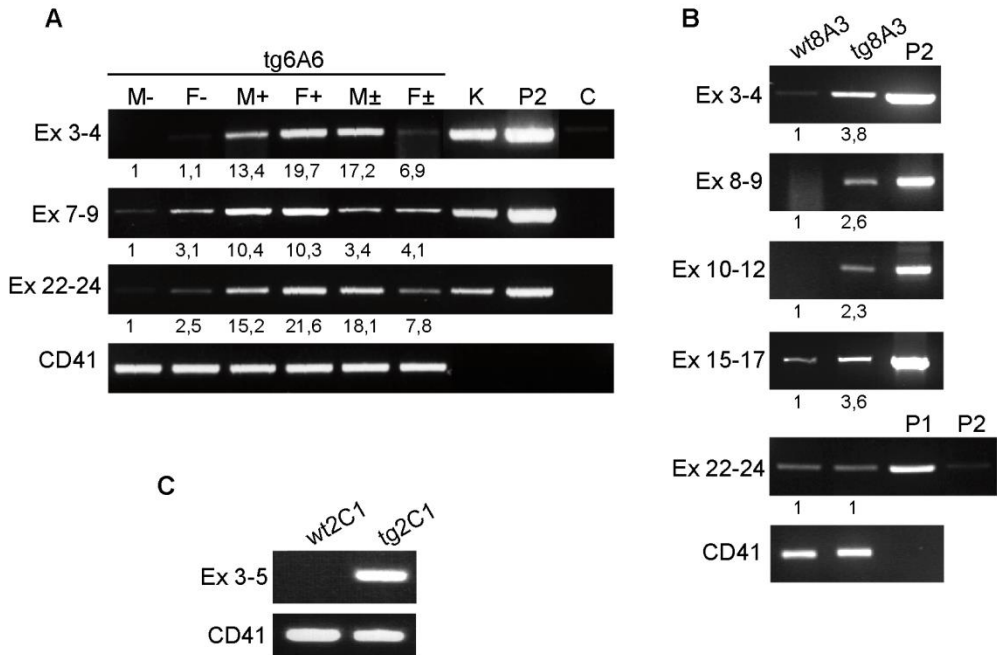


Figura R-1. Análisis de la expresión de los transgenes C3G y C3GΔCat por RT-PCR. (A) La expresión del transgén C3G completo, de la línea 6A6, fue analizada en plaquetas purificadas de animales de genotipo silvestre (-), homocigóticos (+) y heterocigóticos (±). (B) Se realizó el mismo análisis para comprobar la expresión de C3GΔCat en animales de la línea 8A3 y sus controles correspondientes. Cada panel muestra la expresión de los exones de C3G indicados, los cuales fueron amplificados con los oligonucleótidos directo y reverso localizados en el primer y último exón respectivamente. K: ADNc de células K562; P1: plásmido pLTR2C3G; P2: plásmido PF4- C3GΔCat-LN; C: mix para PCR sin ADNc; M: *male*; F: *female*; wt: genotipo silvestre (*Wild Type*); tg: transgénico. Se muestran los valores relativos de densitometría. (C) Expresión de los transgenes en megacariocitos. Se aisló ARN de células de médula ósea de un ratón transgénico C3G-2C1 y su hermano silvestre, tratadas con TPO durante 7 días, y se realizó una transcripción reversa para obtener el ADNc. Posteriormente se realizó una PCR utilizando un set de oligonucleótidos específicos para amplificar los exones del 3 al 5. Se determinó la expresión de CD41 como control en todos los casos. Todos los valores están relativizados frente a plaquetas wt *male* y normalizados frente a CD41.

Para corroborar que la sobreexpresión detectada estaba restringida a plaquetas y megacariocitos comprobamos la sobreexpresión de algunos exones del transgén C3GΔCat en otros tejidos de las líneas transgénicas de ratón generadas, como hígado o pulmón. Como cabía esperar, no se detectó expresión de los transgenes en estos tejidos (Figura R-2).

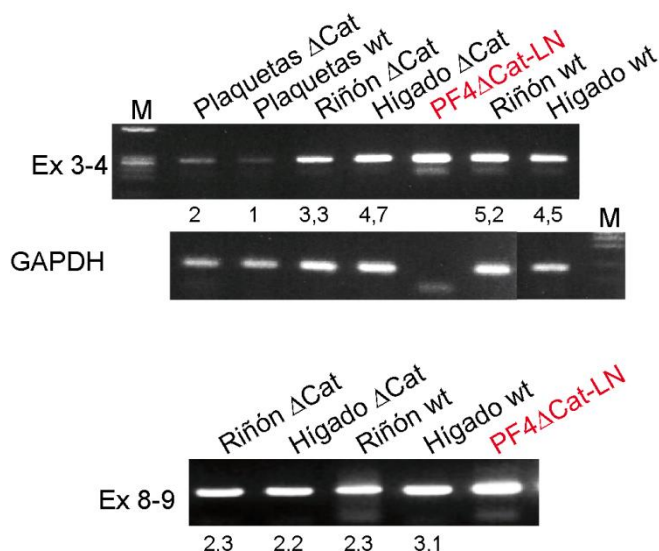


Figura R-2. Expresión del transgén C3GΔCat en tejidos. Se aisló ARN total a partir de tejidos homogeneizados de hígado, pulmón y plaquetas purificadas de animales transgénicos C3GΔCat (ΔCat) y animales de genotipo silvestre. A partir de la transcripción reversa se obtuvo ADNc que se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos 3F/4R y 8F/9R. Se utilizó GAPDH como normalizador. El plásmido PF4ΔCat-LN se utilizó como control positivo de la PCR. M: marcador de peso molecular. Todos los valores están relativizados frente a plaquetas wt y normalizados frente a GAPDH.

Una vez detectada la sobreexpresión de los transgenes en las diferentes líneas analizamos el incremento en los niveles de las proteínas transgénicas, C3G y C3GΔCat, en células de la médula ósea diferenciadas a megacariocitos mediante cultivo con TPO durante 7 días. En la Figura R-3 se observa claramente una sobreexpresión de los transgenes, detectada mediante Western Blot, en los lisados celulares de megacariocitos transgénicos en comparación con megacariocitos de ratones de genotipo silvestre (Figura R-3).

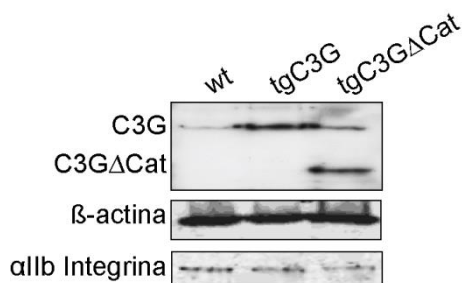


Figura R-3. Análisis de la expresión proteica de los transgenes C3G y C3GΔCat en células diferenciadas de médula ósea. Las células obtenidas a partir de médula ósea de ratones transgénicos C3G-2C1, C3GΔCat-8A3 y los controles correspondientes, se diferenciaron con TPO durante 7 días y se lisaron con tampón RIPA. La expresión de C3G se detectó por Western Blot utilizando el anticuerpo anti-C3G (H-300), y se normalizó con anticuerpos anti-β-actina y anti-integrina αIIb (Tabla M-6).

La expresión de los transgenes en plaquetas también se monitorizó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos frente a C3G (antisuero de conejo anti-C3G #1008) (Guerrero *et al* 1998; Guerrero *et al* 2004), detectados con anticuerpos secundarios anti-conejo marcados con Cy5, y CD41-FITC como marcador plaquetario (Tabla M-3). El incremento de los niveles de las proteínas C3G y C3GΔCat en plaquetas transgénicas queda demostrado por el incremento en células doblemente positivas para CD41 y C3G-Cy5 en dichas plaquetas en comparación con las de ratones de tipo silvestre, tal y como se observa en la Figura R-4, aunque los niveles de expresión mostraron variabilidad entre individuos.

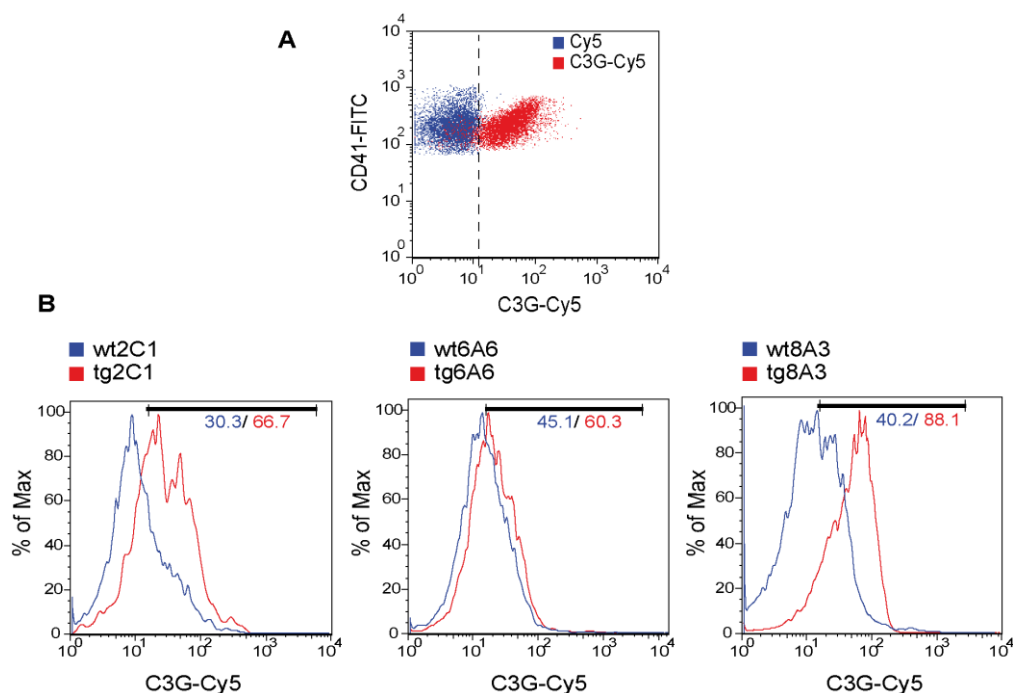


Figura R-4. Detección específica de los niveles de C3G intracelular por citometría de flujo.

(A) Representación gráfica de plaquetas marcadas con los anticuerpos fluorescentes CD41-FITC/anti-conejo-Cy5 en ausencia (azul) o presencia (rojo) del antisero C3G#1008 (Tabla M-3). (B) Representación mediante histogramas de plaquetas (seleccionadas por su marcaje con el anticuerpo CD41-FITC) de un animal transgénico 2C1 (histograma de la izquierda), 6A6 (histograma central) y 8A3 (histograma de la derecha), con sus controles correspondientes, marcadas con anti-C3G-1008/Cy5 (C3G-Cy5). Se muestran los porcentajes de expresión de C3G. Los gráficos son representativos de 5 experimentos independientes: wt: genotipo silvestre (*Wild Type*); tg: transgénico.

5.2 LOS TRANSGENES C3G Y C3GΔCat ALTERAN LA FUNCIÓN HEMOSTÁTICA DE LAS PLAQUETAS

Una vez caracterizada la sobreexpresión de los transgenes C3G y C3GΔCat en las líneas de ratones transgénicos generados, realizamos una serie de estudios para determinar el efecto de estos transgenes en la función plaquetaria. Primeramente, mediante ensayos de cortes de cola realizados en ratones transgénicos y sus hermanos de tipo silvestre, analizamos si C3G está implicado en la hemostasia. Se analizó, tanto los tiempos de sangrado como la masa de sangre obtenida hasta la completa coagulación. Ambos tipos de medidas fueron tomadas dos veces en cada animal; la primera medida se realizó en el momento del destete y la segunda a los 6 meses de edad. En el momento del destete, los animales transgénicos C3G mostraron tiempos de sangrado significativamente más cortos que los controles (media \pm SEM: 44,0 \pm 4,5 segundos vs 64,2 \pm 6,7 segundos, respectivamente, $p=0,024$) (Figura R-5A, panel izquierdo). Sin embargo, la media del tiempo de sangrado de los animales transgénicos

C3GΔCat fue significativamente más alta que la de sus hermanos silvestres ($125,8 \pm 17,7$ segundos vs $86,8 \pm 7,5$ segundos, respectivamente, $p=0,0052$, Figura R-5A, panel izquierdo). La misma tendencia se observó en la cantidad de sangre obtenida (Figura R-5A, panel derecho).

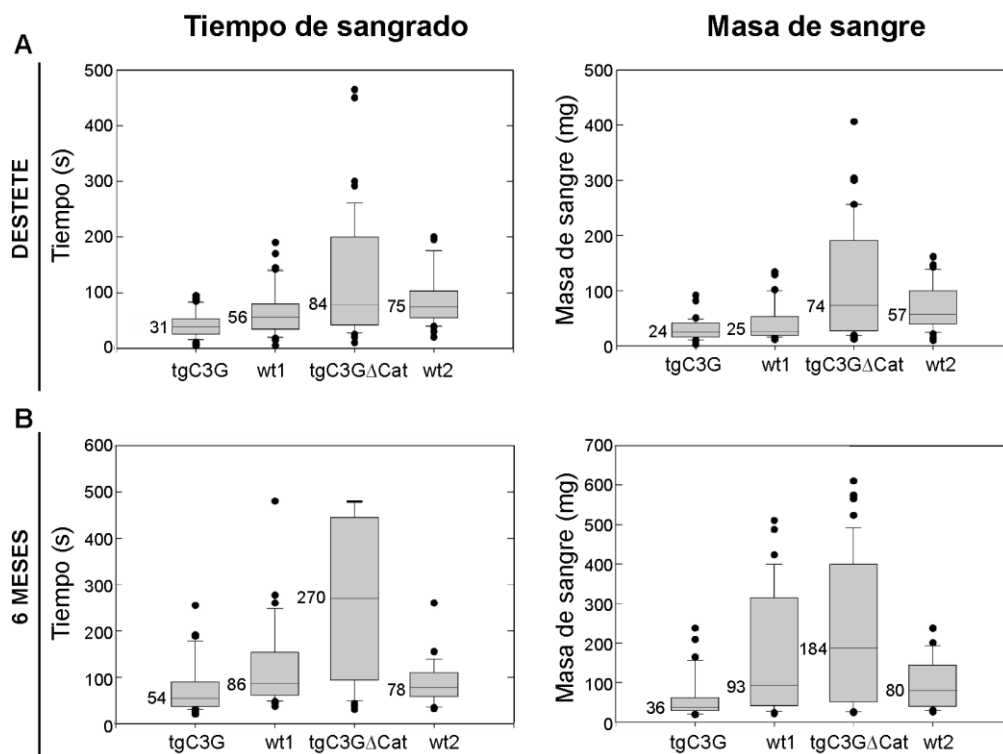


Figura R-5. Los ratones transgénicos muestran una hemostasia alterada. (A). Los ensayos de sangrado en cortes de cola se llevaron a cabo en animales transgénicos C3G (tgC3G) y C3GΔCat (tgC3GΔCat) y sus controles de genotipo silvestre correspondientes (wt1 y wt2 respectivamente) en el momento del destete. Los gráficos representan el tiempo de sangrado, así como la masa de sangre obtenida, de 30-40 animales de cada genotipo. Se indican los valores de la mediana. (B). El experimento se repitió en los mismos animales a los 6 meses de edad.

Las diferencias encontradas en cuanto al tiempo de sangrado, fueron acentuadas a los 6 meses de edad, especialmente en los ratones transgénicos C3GΔCat ($74,1 \pm 11,0$ segundos en ratones transgénicos C3G vs $122,1 \pm 17,3$ segundos en ratones de genotipo silvestre; $p=0,0275$ y $254 \pm 24,8$ segundos en ratones transgénicos C3GΔCat vs $89,3 \pm 10,2$ segundos en los ratones de genotipo silvestre; $p=0,0000085$, Figura R-5B, panel izquierdo). Esta tendencia también se observó en la masa de sangre obtenida (Figura R-5B, panel derecho).

Para descartar que este desorden hemostático, sea debido a alteraciones en el número de plaquetas producido por la expresión de los transgenes, realizamos un recuento del número

de plaquetas (Tabla R-1), así como una evaluación del número de eritrocitos, nivel de hematocrito y hemoglobina (Tabla R-2).

Tabla R-1. Los transgenes C3G y C3GΔCat no modifican el número de plaquetas. Se realizó un recuento del número de plaquetas de animales tgC3G, tgC3GΔCat y controles, utilizando un HemavetCounter HV950FS, obteniéndose valores similares en los distintos genotipos. Los valores *p* para animales transgénicos vs hermanos de genotipo silvestre fueron los siguientes: *p*=0,12 para machos 2C1, *p*=0,33 para hembras 2C1, *p*=0,08 para machos 6A6, *p*=0,34 para hembras 6A6, *p*=0,48 para machos 8A3, *p*=0,27 para hembras 8A3. NA: número de animales. Plt: plaquetas.

Genotipo	Sex	NA	Plt($\times 10^3/\mu\text{l}$) media \pm SEM
Transgénico 2C1	M	25	1.145 \pm 101
	F	21	1.059 \pm 50
Silvestre 2C1	M	11	961 \pm 32
	F	12	1.020 \pm 51
Transgénico 6A6	M	31	1.038 \pm 31
	F	37	996 \pm 35
Silvestre 6A6	M	33	1.120 \pm 48
	F	29	974 \pm 35
Transgénico 8A3	M	20	1.194 \pm 49
	F	24	1.063 \pm 51
Silvestre 8A3	M	13	1.191 \pm 68
	F	14	1.000 \pm 56

No encontramos diferencias significativas en el número de plaquetas entre los distintos genotipos, por lo que podemos concluir que el desorden hemostático observado en los animales transgénicos C3G y C3GΔCat no se debe a defectos en la formación plaquetaria (Tabla R-1). Además, tampoco observamos cambios significativos ni en el hematocrito ni en los niveles de hemoglobina en los animales transgénicos (Tabla R-2), lo que descarta que los animales transgénicos C3GΔCat sufran hemorragias espontáneas o anemia. Por tanto, los resultados obtenidos indican que el producto del gen C3G participa en la coagulación de las plaquetas a través de mecanismos dependientes de su dominio catalítico, lo que puede implicar la participación de Rap1 en este efecto.

Tabla R-2. Recuento de eritrocitos (*Red Blood Cells*, RBC) y valores relacionados con la serie roja en ratones transgénicos C3G y C3GΔCat y sus controles silvestres. Los valores representan la media \pm SEM. Los valores *p* para los animales transgénicos vs animales controles de genotipo silvestre son los siguientes: Hematocrito: *p*=0,16 para animales 6A6, *p*=0,16 para animales 2C1, *p*=0,09 para animales 8A3; Hemoglobina: *p*=0,051 para 6A6, *p*=0,24 para 2C1, *p*=0,12 para 8A3; RBC: *p*=0,16 para 6A6, *p*=0,17 para 2C1 y *p*=0,19 para 8A3.

Genotipo	Hematocrito (%)	Hemoglobina (gm/dL)	RBC (M/mL)
Silvestre 6A6 (n=19)	44,68 \pm 9,92	13,26 \pm 1,45	8,99 \pm 1,04
Transgénico 6A6 (n=19)	47,47 \pm 6,96	13,96 \pm 1,06	9,25 \pm 0,50
Silvestre 2C1 (n=22)	44,76 \pm 7,51	13,77 \pm 0,75	9,02 \pm 0,35
Transgénico 2C1 (n=29)	46,34 \pm 5,08	13,90 \pm 0,46	9,12 \pm 0,36
Silvestre 8A3 (n=20)	47,81 \pm 7,46	13,92 \pm 1,02	9,34 \pm 0,50
Transgénico 8A3 (n=28)	45,69 \pm 3,12	14,21 \pm 0,68	9,45 \pm 0,37

5.3 LOS RATONES TRANSGÉNICOS C3G MOSTRARON UN INCREMENTO EN EL NÚMERO DE NEUTRÓFILOS

Como hemos mencionado previamente, no hemos encontrado diferencias en el número de plaquetas, entre los animales transgénicos para C3G y sus hermanos de genotipo silvestre (Tabla R-1). Sin embargo, los análisis hemocitométricos mostraron un incremento significativo en el número de neutrófilos en los ratones transgénicos C3G en comparación con sus hermanos silvestres (Tabla R-3).

Tabla R-3. El transgén C3G incrementa el número de neutrófilos en sangre periférica. Se realizó un recuento del número de neutrófilos en sangre periférica en el Hemavet Counter HV950FS. La tabla muestra la media \pm SEM (n=35 ratones tgC3G y 21 ratones wtC3G) de los porcentajes de neutrófilos en ratones tgC3G y sus correspondientes controles de genotipo silvestre (wtC3G), así como los diferentes *p* valores obtenidos. Cada medida se tomó en el mismo ratón a diferentes tiempos.

Edad (meses)	tgC3G	wtC3G	<i>P</i> valor
4	25,35 \pm 8,49	20,96 \pm 5,18	0,033
6	27,06 \pm 7,94	22,07 \pm 5,06	0,024
8	29,59 \pm 7,68	25,24 \pm 5,94	0,033
10	31,00 \pm 8,54	24,76 \pm 6,27	0,064

Estos resultados han sido comprobados por citometría de flujo usando marcadores específicos de granulocitos, Ly-6G/6C (Gr1) y CD11b (Mac1) (Figura R-6). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en el número de neutrófilos entre los animales transgénicos C3GΔCat y sus controles (Figura R-7).

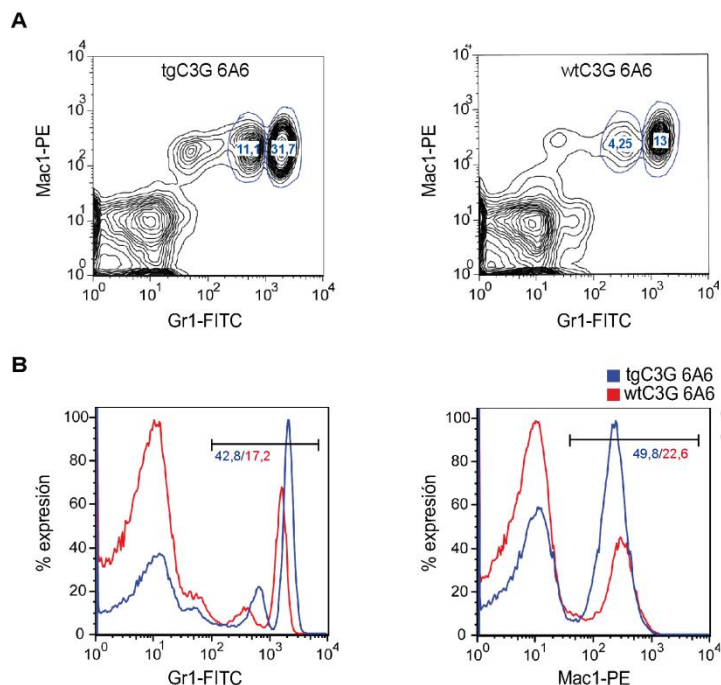


Figura R-6. La expresión transgénica de C3G en plaquetas induce un incremento en el número de neutrófilos. (A) Gráficos de contorno representativos que muestran el porcentaje de células doblemente marcadas para Gr1-FITC/Mac1-PE en lisados de sangre de un ratón transgénico 6A6 y su correspondiente control. (B) Los histogramas representan los perfiles superpuestos de células marcadas para Gr1-FITC (panel izquierdo) y Mac1-PE (panel derecho) correspondientes a los gráficos mostrados en (A). Los números indican el porcentaje de células que expresan Gr1 y Mac1 respectivamente. Los gráficos son representativos del análisis de más de 20 ratones diferentes de cada genotipo. Se han encontrado resultados similares en las líneas transgénicas 2C1. wt: tipo silvestre, tg: transgénico.

Igualmente, se comprobaron estos resultados mediante frotis de sangre donde pudimos observar un elevado número de neutrófilos en las preparaciones de animales transgénicos para C3G (Figura R-7).

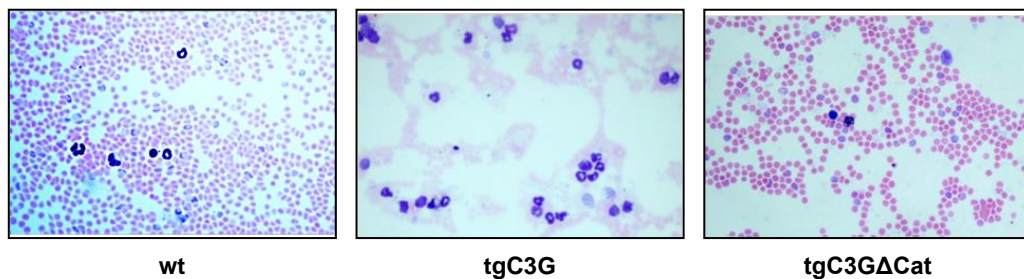


Figura R-7. Comprobación del incremento del número de neutrófilos mediante frotis de sangre. Se muestran figuras representativas de frotis de sangre de un ratón silvestre (wt), transgénico para C3G (tgC3G) y transgénico para C3GΔCat (tgC3GΔCat). La sangre, fue fijada y teñida con hematoxilina y eosina.

Por otra parte, no se detectó expresión de los transgenes en granulocitos purificados obtenidos por diferenciación con hidrocortisona a partir de médula ósea (datos no mostrados), lo que está de acuerdo con la expresión restringida del promotor PF4 en megacariocitos y plaquetas. Por lo tanto, el incremento en el porcentaje de neutrófilos observado debe ser un efecto indirecto de la expresión del transgén C3G en plaquetas.

5.4 LOS TRANSGENES C3G Y C3GΔCat MODIFICAN LA RESPUESTA DE LAS PLAQUETAS A SUS AGONISTAS

En resultados anteriores hemos visto que los ratones transgénicos C3G y C3GΔCat tienen alteraciones hemostáticas (Figura R-5), sin embargo, éstas no parecen deberse a diferencias en el número de plaquetas. Por tanto, el siguiente paso fue estudiar si la expresión de los transgenes modifica la actividad plaquetaria, lo que estaría de acuerdo con las diferencias en la función hemostática observadas entre animales transgénicos y silvestres. Para ello hemos llevado a cabo dos aproximaciones experimentales: monitorizar la activación de las plaquetas mediante citometría de flujo y medir el grado de agregación plaquetaria. En ambos casos las plaquetas fueron estimuladas usando los agonistas plaquetarios, trombina, PMA y ADP (Tabla M-4), los cuales se sabe que son capaces de activar a Rap1 (Chrzanowska-Wodnicka *et al* 2005).

5.4.1 La sobreexpresión de C3G estimula la activación plaquetaria a través de su función GEF.

Para estudiar el grado de activación de las plaquetas hemos realizado dos aproximaciones experimentales, ambas basadas en citometría de flujo:

- **Determinación de la expresión de la P-selectina en la superficie celular** como medida del grado de desgranulación plaquetaria inducida por el agonista. La P-selectina se encuentra localizada en la membrana de los gránulos α , de forma que, cuando éstos se fusionan con la membrana para liberar su contenido, la P-selectina se integra en la membrana plasmática. Como marcador de P-selectina se utilizó el anticuerpo Anti-ratón CD62P marcado con FITC (Tabla M-3).

- **Monitorización de la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$.** La activación de la integrina, se monitorizó utilizando dos metodologías: (i) Detección con un anticuerpo específico (clon JON/A marcado con PE), el cual se une exclusivamente a la integrina activada (Nieswandt *et al* 2007); (ii) detección utilizando fibrinógeno marcado (Alexa Fluor® 488 *labeled fibrinogen*, (Tabla M-3), que, de manera similar, se une a la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ sólo cuando ésta se encuentra

en una conformación activa. Este último método sería también una medida de la señalización *inside-out*.

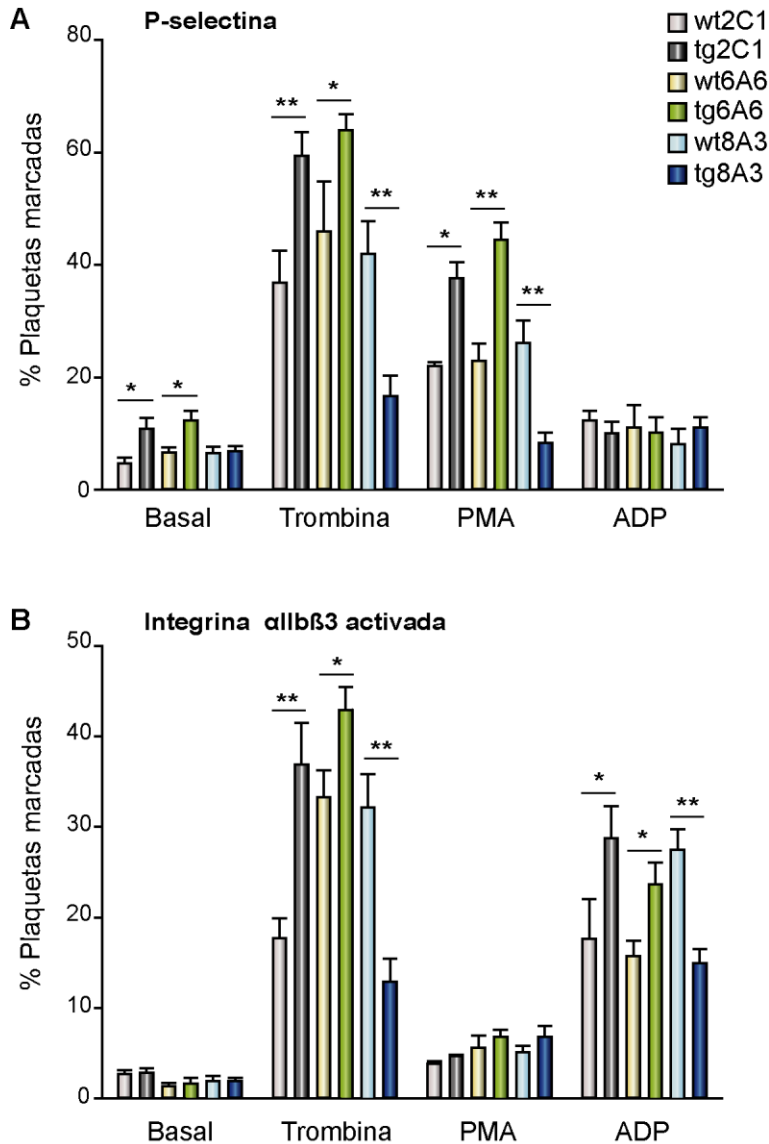


Figura R-8. Las plaquetas de ratones tgC3G y tgC3G Δ Cat son activadas de forma diferencial en respuesta a agonistas. La sangre procedente de animales transgénicos y de sus correspondientes controles, fue lavada y estimulada con PMA (2 μM), trombina (0,2 U/ml) o ADP (10 μM) e incubada con (A) anticuerpos anti CD62P-FITC, para determinar el porcentaje de plaquetas que expresan P-selectina en su superficie celular, o (B) fibrinógeno conjugado con Alexa-Fluor[®] 488 para determinar el porcentaje de plaquetas con integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ activada. Los histogramas representan la media \pm SEM de 10 experimentos independientes. * $p<0,05$, ** $p<0,01$. Wt: genotipo silvestre; tg: transgénico.

Como se muestra en la Figura R-8A, las plaquetas obtenidas de ratones transgénicos C3G (líneas 2C1 y 6A6) mostraron niveles de expresión de P-selectina en la superficie celular significativamente más elevados que las de sus hermanos silvestres, en respuesta a trombina y PMA. Sin embargo, estos agonistas produjeron una respuesta significativamente más reducida en plaquetas obtenidas de los animales transgénicos C3GΔCat (línea 8A3) en comparación con plaquetas de sus controles de tipo silvestre. De forma similar, las plaquetas tgC3G mostraron una mayor activación de la integrina αIIbβ3 en respuesta a la trombina y al ADP, medida por la señal del fibrinógeno conjugado con Alexa Flúor® 488 unido (Figura R-8B). Por el contrario, la integrina αIIbβ3 expresada en las plaquetas de los ratones transgénicos C3GΔCat mostró menos respuesta a los agonistas que las plaquetas de los animales control (Figura R-8B). Se obtuvieron resultados similares con el anticuerpo JON/A-PE con respecto a la activación por trombina (datos no mostrados). Bajo nuestras condiciones experimentales, el agonista PMA apenas estimuló a la integrina αIIbβ3, mientras que el ADP tampoco afectó significativamente los niveles de expresión de la P-selectina en superficie celular, en consonancia con lo observado por otros autores (Nieswandt *et al* 2007).

5.4.2 La sobreexpresión de C3G estimula la agregación plaquetaria a través de su función GEF.

Como se comentó en el apartado de Introducción, tras su activación, las plaquetas interaccionan entre sí a través de puentes de fibrinógeno para formar un tapón plaquetario, proceso conocido como agregación. Para estudiar si la expresión transgénica de C3G y C3GΔCat afectaba a este proceso evaluamos el grado de agregación plaquetaria a partir de sangre de los ratones transgénicos C3G, C3GΔCat y de sus controles, en respuesta a colágeno, utilizando un agregómetro Chrono-Log (Haverton, USA).

En concordancia con los resultados de activación, las plaquetas tgC3G mostraron un incremento en el grado de agregación plaquetaria inducida por colágeno en comparación con las plaquetas de animales de genotipo silvestre. En cambio, las plaquetas de los animales transgénicos C3GΔCat no mostraron capacidad de agregación en respuesta al colágeno (Figura R-9).

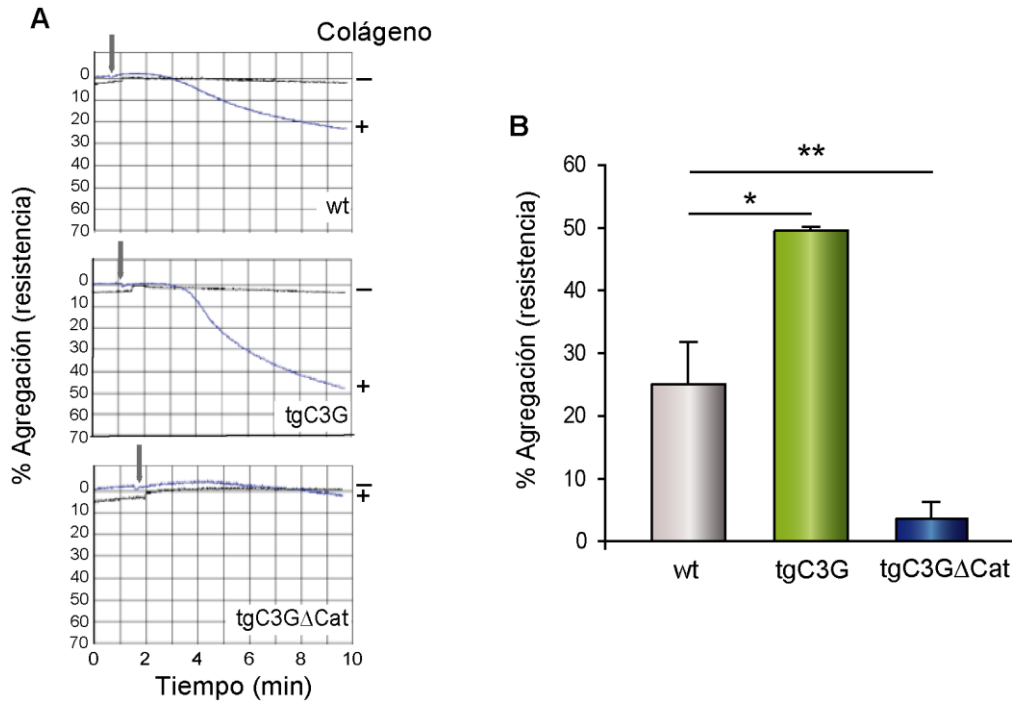


Figura R-9. Los animales transgénicos muestran alteraciones en la agregación plaquetaria.

(A) Trazos representativos de la agregación de plaquetas de animales de genotipo silvestre (wt), tgC3G y tgC3GΔCat tratadas con colágeno (5 μ g/ml). Las flechas indican el momento de la adición del agonista. Líneas (-): plaquetas no estimuladas; Líneas (+): plaquetas estimuladas con colágeno. (B) El histograma representa la media \pm SEM del porcentaje de agregación plaquetaria (como una media de la resistencia eléctrica) de las plaquetas tratadas con colágeno en tres ratones de cada genotipo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs genotipo silvestre (wt). Los valores para los animales de genotipo silvestre incluyen un animal por cada línea (2C1, 6A6 y 8A3).

Resultados similares de agregación se obtuvieron en respuesta a ADP, PMA y el péptido para el receptor PAR-4 (Tabla M-4) utilizando un agregómetro "Multiplate" (Verum Diagnostica GmbH) (Figura R-10).

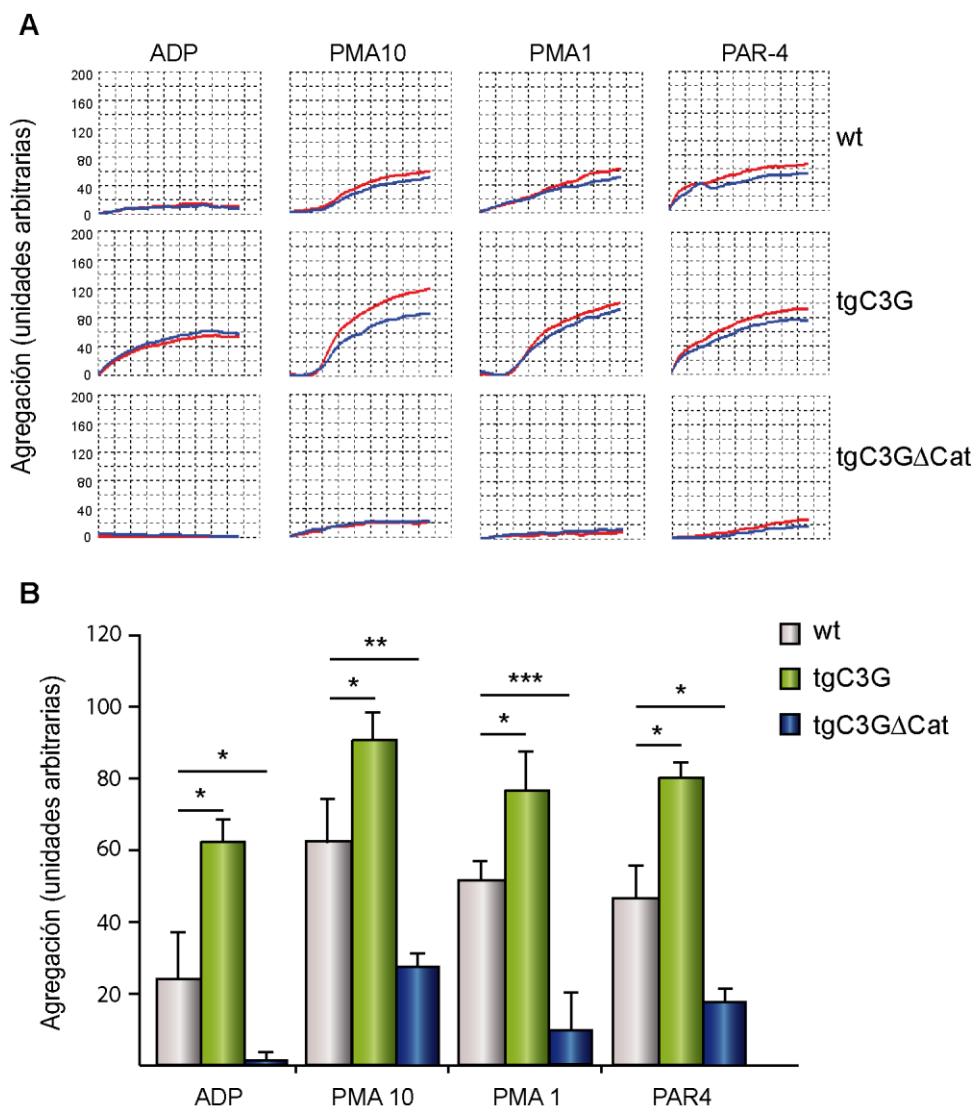


Figura R-10. Representación del grado de agregación de plaquetas de ratones transgénicos en respuesta a diferentes agonistas. (A). Trazos representativos de agregación de plaquetas procedentes de animales de genotipo silvestre (wt), tgC3G y C3GΔCat tratadas con ADP (6,6 μM), PMA (10 μM y 1 μM) y péptido PAR-4 (0,66mM) utilizando el agregómetro Multiplate (Verum diagnostica GmbH). (B). Histograma que representa la media ± SEM de los valores de agregación (unidades arbitrarias) de las plaquetas obtenidas de 3-5 ratones de cada genotipo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ frente al genotipo silvestre (wt).

Todos estos experimentos *in vitro* están en concordancia con los resultados obtenidos en el ensayo *in vivo* de sangrado en cortes de cola, y sugieren que el producto del gen C3G participa en la activación plaquetaria mediada por PMA, trombina, ADP y colágeno, posiblemente a través de rutas en las que participa Rap1. Además, el hecho de que los

transgenes modifiquen tanto la expresión de P-selectina, como la unión de la integrina a fibrinógeno y la agregación plaquetaria, indican que C3G participaría tanto en rutas de señalización *outside-in* como *inside-out*.

5.5 LA SOBREEXPRESIÓN DE C3G AUMENTA LA TROMBOSIS IN VIVO

Los resultados anteriores indican que la expresión transgénica de C3G en las plaquetas de ratón incrementa su capacidad de activación y agregación. La pregunta que surge es si la sobreexpresión de C3G en las plaquetas podría conducir a una mayor formación de trombos *in vivo*, en condiciones de estimulación.

Para estudiar si el producto del transgén C3G tiene algún papel relevante en el proceso de trombosis, se inyectó una mezcla de colágeno y epinefrina en la vena yugular de los ratones, provocando así la agregación plaquetaria y formación de trombos, hecho que se verá reflejado en una disminución de plaquetas en sangre circulante. En concreto, para monitorizar la formación de trombos, se hizo un conteo de plaquetas antes y después de la inyección de la mezcla colágeno-epinefrina. Una mayor disminución del número de plaquetas con respecto a la situación inicial indicaría una mayor agregación plaquetaria, por lo que se consideró el porcentaje de disminución del número de plaquetas, con respecto a la situación inicial, como el porcentaje de agregación. El análisis estadístico de los datos obtenidos mostró una diferencia significativa en la disminución de plaquetas en sangre, tras la inyección de los agonistas, entre los ratones transgénicos para C3G y los ratones de genotipo silvestre (Figura R-11). Estos resultados sugieren una mayor capacidad trombótica de las plaquetas tgC3G, lo que está en concordancia con los resultados obtenidos, tanto en los experimentos *in vitro*, como en los experimentos de sangrado en cortes de cola.

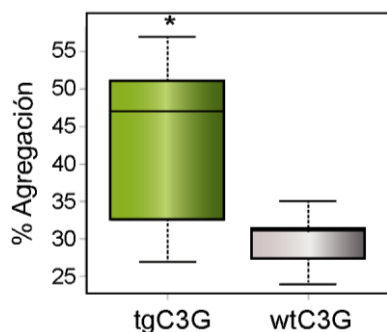


Figura R-11: La expresión transgénica de C3G incrementa la trombosis *in vivo*. El porcentaje de agregación fue significativamente mayor en los ratones que sobreexpresan C3G en plaquetas con respecto a los controles de genotipo silvestre (n=7). $p < 0,05$. tgC3G: ratones tgC3G; wt: ratones de genotipo silvestre.

Estudios similares llevados a cabo con animales transgénicos para el mutante C3G Δ Cat no revelaron diferencias significativas con respecto a sus controles (datos no mostrados).

A continuación, se evaluó si esta mayor agregación se correspondía con una mayor formación de trombos. Se sabe que los trombos formados en la vena yugular viajan a los pulmones (Allende 2012), por lo que tras el experimento se analizaron cortes histológicos de los pulmones mediante tinción con hematoxilina y eosina. Efectivamente, los pulmones de los ratones tratados mostraron tromboembolismos causados por la agregación plaquetaria en el sistema circulatorio. A pesar de no encontrar diferencias en el número de trombos entre los dos genotipos, sí que se apreciaron diferencias en el tamaño de los mismos. Específicamente, los trombos encontrados en los pulmones de ratones transgénicos para C3G, están mejor delimitados y son más grandes que los de ratones de genotipo silvestre (Figura R-12).

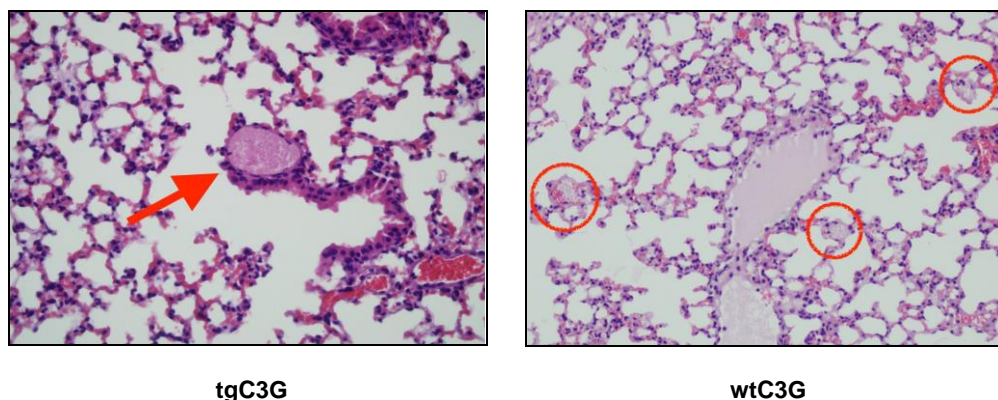


Figura R-12. Análisis de la presencia de trombos pulmonares mediante cortes histológicos. Imágenes representativas de cortes histológicos de pulmón de ratones tgC3G y control (wtC3G) teñidos con hematoxilina/eosina. El trombo señalado (flecha roja) en el pulmón del ratón tgC3G es mucho más grande y está mejor delimitado que los detectados en el pulmón del control silvestre (círculos rojos).

5.6 ACTIVACIÓN DE Rap1 EN PLAQUETAS TRANSGÉNICAS: Rap1 MEDIA EL EFECTO DE C3G

Los resultados de activación plaquetaria mostrados en la Figura R-8 indican que la sobreexpresión de C3G aumenta la activación de la integrina plaquetaria, la cual se sabe que está mediada por Rap1 (Shattil *et al* 1998; de Bruyn *et al* 2003; Stork *et al* 2005). Por otro lado, la menor activación de las plaquetas tgC3GΔCat sugiere que dicho mutante se comportaría como un mutante de C3G dominante negativo, inhibiendo a Rap1. Para confirmar esta hipótesis realizamos un estudio de activación de Rap1 en PRP fresco, estimulado con 0,2 U/ml de trombina durante 1 minuto, condiciones validadas por muchos autores (Franke *et al* 2000; Crittenden *et al* 2004). Los resultados muestran un incremento en la activación basal de Rap1 en plaquetas de ratones transgénicos para C3G en comparación con las de tipo silvestre, mientras que las plaquetas C3GΔCat mostraron niveles de activación de Rap1 menores que sus respectivos controles (Figura R-13A). De forma similar, la activación de Rap1 inducida por

trombina fue mayor en plaquetas de animales tgC3G que en las plaquetas de los animales de tipo silvestre, mientras que las plaquetas de los tgC3GΔCat estimuladas con trombina, mostraron niveles más bajos de Rap1-GTP que las de sus hermanos controles. Estos resultados están de acuerdo con los datos de actividad mostrados en la Figura R-8 e indican que el papel de C3G en la activación plaquetaria es dependiente de su función como GEF de Rap1.

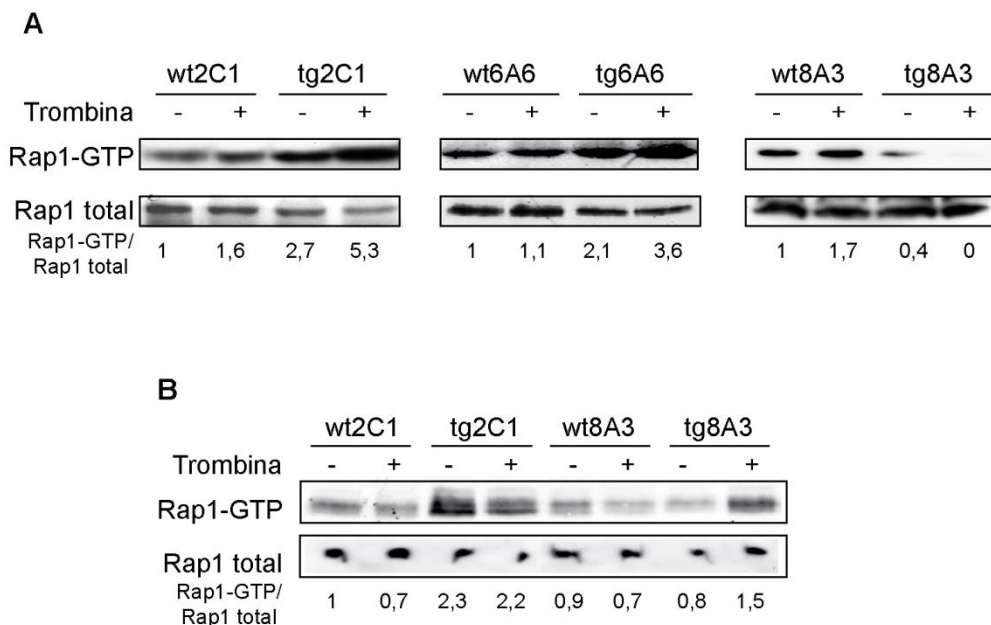


Figura R-13. Rap1 se regula de forma diferencial en plaquetas de animales transgénicos C3G y C3GΔCat. Plaquetas procedentes de ratones tgC3G (2C1 y 6A6) o tgC3GΔCat (8A3) y sus controles de tipo silvestre se estimularon (+) o no (-) con 0,2 U/ml de trombina durante 1 min bajo condiciones de (A) no agregación y (B) agregación. Posteriormente las plaquetas se lisaron y se aisló la proteína Rap1 activada mediante su unión a GST-RalGDS-RBD, la cual se detectó por Western Blot con anticuerpos anti-Rap1 (ver Tabla M-6). Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos con resultados similares. Se indica la relación Rap1-GTP/Rap1-Total. Los valores se normalizaron con respecto a los de plaquetas no estimuladas. wt: genotipo silvestre, tg: transgénico.

Se ha descrito que bajo condiciones de agregación plaquetaria, la activación de Rap1 inducida por trombina disminuye rápidamente debido a un fenómeno de “desensibilización” que consiste en la translocación de Rap1 a fracciones del citoesqueleto insolubles en detergentes no iónicos, como Tritón-X-100 (Franke *et al* 2000). Cuando se llevó a cabo el experimento bajo esas mismas condiciones (plaquetas agitadas durante la incubación), observamos una rápida inactivación de Rap1 en plaquetas tgC3G, mucho mayor que en plaquetas control. Por el contrario, los niveles de Rap1-GTP permanecieron elevados en plaquetas tgC3GΔCat, con respecto a plaquetas wtC3GΔCat, lo que indica una inactivación más lenta de las plaquetas que

expresan el mutante (Figura R-13B). Todos estos resultados indican que la sobreexpresión de los transgenes C3G y C3GΔCat regula de forma positiva y negativa, respectivamente, la activación de Rap1, lo que concuerda con el efecto de la expresión de estos transgenes en la agregación plaquetaria.

5.7 C3G ES UN IMPORTANTE MEDIADOR DE LA RUTA DE PKC QUE CONDUCE A LA ACTIVACIÓN DE Rap1.

Estudios previos han mostrado que la agregación plaquetaria estimulada por PMA no se altera en plaquetas de ratones *knock out* para CalDAG-GEFI (Crittenden *et al* 2004). Esto sugiere la existencia de otros GEF de Rap1 que actuarían en la activación de Rap1 mediada por PKC en plaquetas. Para saber si C3G podría ser el Rap1-GEF que contribuye a la ruta PKC-Rap1 en plaquetas, realizamos ensayos de activación de Rap1 en PRP, procedente de plaquetas de nuestros ratones transgénicos y controles, estimulado con PMA 0,2 μM durante 5 minutos en presencia o en ausencia del inhibidor de PKC, bisindolilmaleimida. Los resultados de la Figura R-14 muestran que, efectivamente, PMA estimula la activación de Rap1, lo que concuerda con estudios previos (Franke *et al* 2000). De nuevo, observamos una mayor estimulación en plaquetas de ratones tgC3G, en comparación con plaquetas de animales de tipo silvestre, de acuerdo con los resultados mostrados en la Figura R-8A, lo que sugiere que C3G participa en la ruta de PKC en plaquetas. Además, el incremento de activación de Rap1 inducido por PMA en plaquetas transgénicas C3G fue prácticamente suprimido por bisindolilmaleimida, lo que indica que la activación de Rap1 a través de PKC estaría mayoritariamente mediada por C3G. Este hecho se confirmó por la ausencia de activación de Rap1 en las plaquetas transgénicas C3GΔCat en respuesta a la activación por PMA.

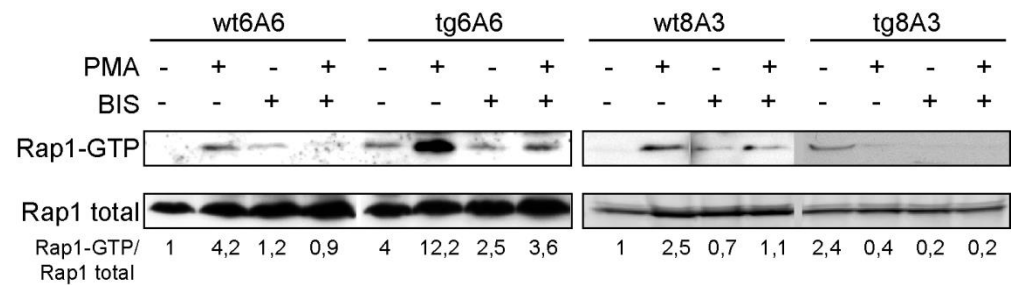


Figura R-14. C3G participa en la activación de Rap1 mediada por PKC. Plaquetas de ratones tgC3G (6A6) y tgC3GΔCat (8A3) y de sus controles correspondientes fueron sometidas a procesos de estimulación (+) o no estimulación (-) con PMA (0,2μM) durante 5 min en presencia y ausencia de bisindolilmaleimida (5μM), que se añadió 5 min antes que el PMA. A continuación, se lisaron las plaquetas y se aisló el Rap1 activado por su unión a GST-RalGDS-RBD, detectándose posteriormente por Western Blot con anticuerpos anti-Rap1. La relación Rap1-GTP/Rap1-Total se indica bajo los blots. Los valores se normalizaron con respecto a los de plaquetas no estimuladas. wt: genotipo silvestre, tg: transgénico. BIS: bisindolilmaleimida.

Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos en ensayos de activación plaquetaria, en los cuales se monitorizó la expresión de P-selectina en superficie de plaquetas mediante tinción con CD62P-FITC. Así, la Figura R-15 muestra que el incremento en la expresión de P-selectina observado en plaquetas de ratones transgénicos C3G estimuladas con PMA, fue completamente eliminado por tratamiento previo con bisindolilmaleimida. Por el contrario, la activación plaquetaria inducida por trombina tan solo fue parcialmente inhibida por el pretratamiento con bisindolilmaleimida (Figura R-15), de acuerdo con la existencia de rutas inducidas por trombina dependientes e independientes de PKC (Franke *et al* 2000). Por lo tanto, hemos identificado a C3G como el GEF de Rap1 responsable de su activación a través de PKC.

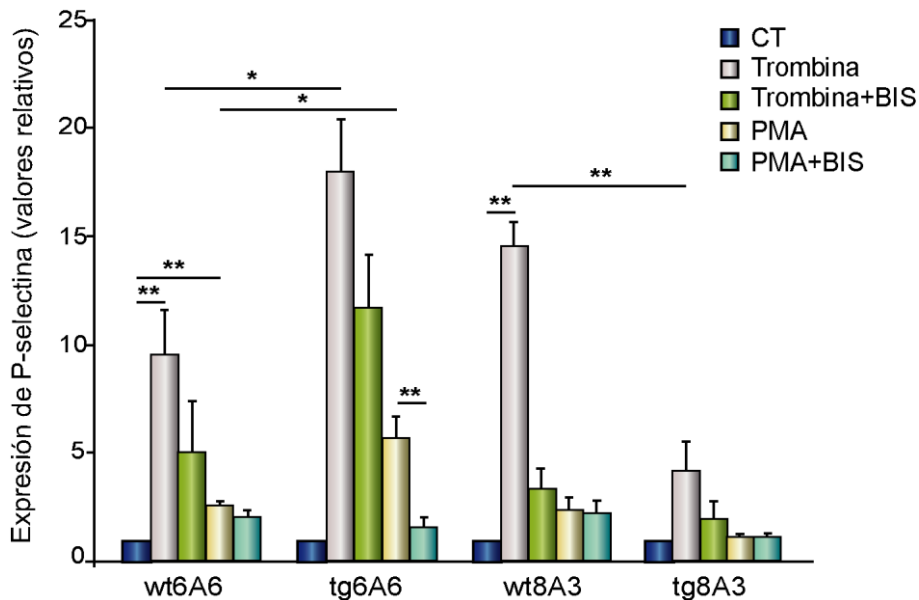


Figura R-15. C3G participa en la activación plaquetaria a través de la ruta PKC-Rap1. La sangre lavada de ratones tgC3G, tgC3G Δ Cat y ratones de genotipo silvestre se estimuló con PMA (0,2 μ M) o con trombina (1U/ml) y se incubó con anticuerpos anti-CD62P-FITC para determinar el porcentaje de plaquetas que expresan P-selectina en superficie. Los histogramas representan la media \pm SEM (n=5). * p <0,05, ** p <0,01. Los valores de los controles fueron normalizados a 1 para una mejor apreciación del efecto del tratamiento en las distintas líneas. wt: genotipo silvestre, tg: transgénico. BIS: bisindolilmaleimida.

5.8 PKC ACTIVA C3G INDIRECTAMENTE, A TRAVÉS DE PROTEINAS TIROSINA KINASA.

Hasta ahora hemos demostrado que en plaquetas transgénicas estimuladas con trombina o PMA, C3G actuaría como un GEF de Rap1 activado por PKC. Se sabe que la activación de C3G depende de su fosforilación en la tirosina 504 (Ichiba *et al* 1999; Radha *et al* 84

a/2011). Sin embargo, PKC es una serina/treoninquinasa, por lo que la activación de C3G por PKC no se produciría de forma directa.

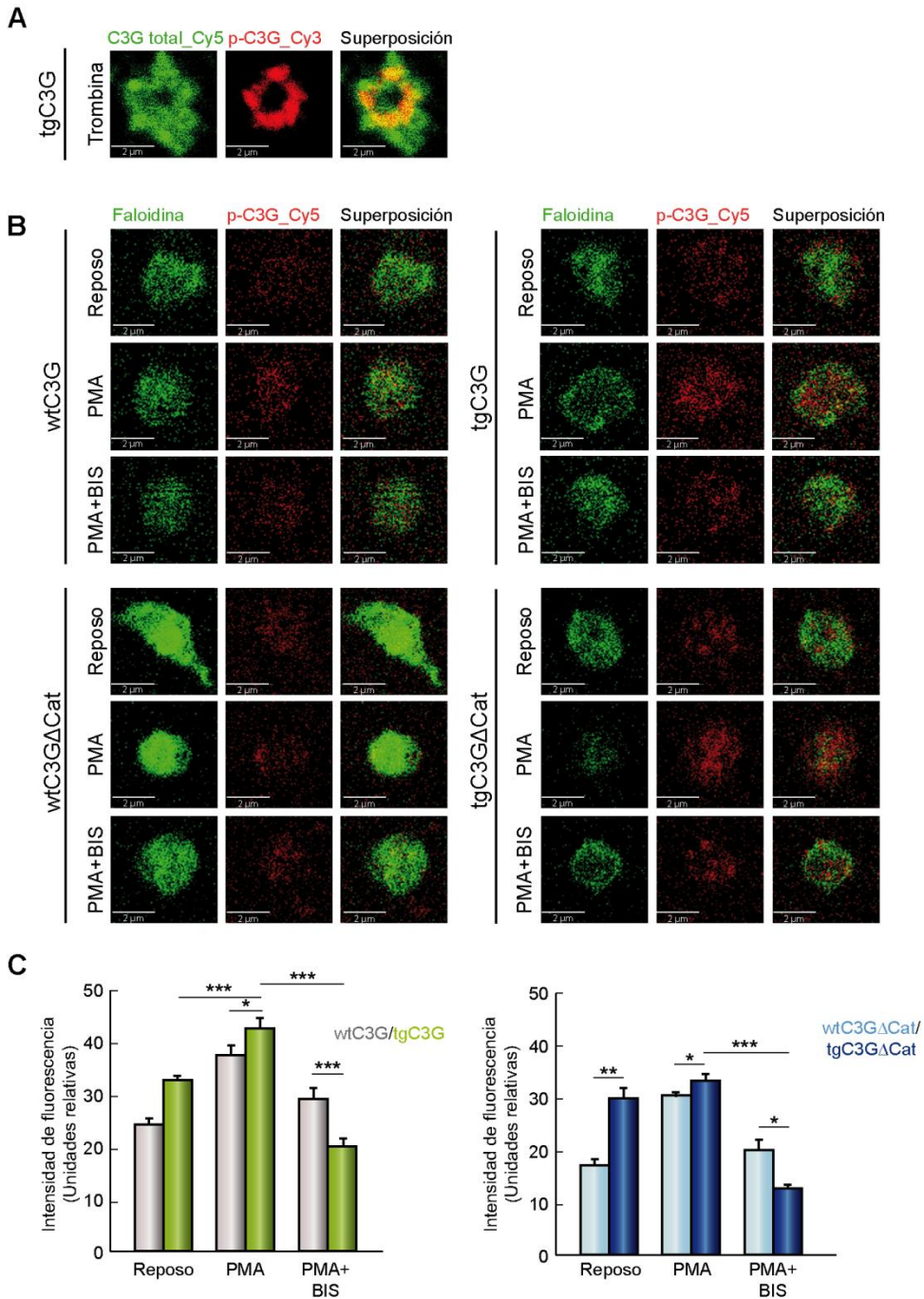


Figura R-16: La fosforilación de los transgenes C3G y C3GΔCat en plaquetas está regulada por la activación de PKC. (A) Imágenes de microscopía confocal plaquetas tgC3G estimuladas con trombina (0,5 U/ml), y marcadas con anti-C3G total (antisuero #1008_Cy5, Tabla M-6) y anti p-C3G_Cy3 para verificar la co-localización entre ambos marcajes. Las imágenes fueron tomadas a los mismos tiempos de exposición con el microscopio Leica SP8. Barra=2 μM. (B) Análisis mediante microscopía confocal del grado de fosforilación de C3G y de C3GΔCat en la tirosina 504. Las imágenes muestran plaquetas de ratones transgénicos C3G y C3GΔCat, así como de sus controles de tipo silvestre, doblemente marcadas con Faloidina (verde) y p-C3G_Cy5 (rojo). Se muestra una plaqueta representativa de los diferentes tratamientos: Reposo, PMA, PMA + bisindolilmaleimida (BIS). Todas las fotografías fueron tomadas con los mismos tiempos de exposición. Barra=2 μM (C) Los histogramas muestran la cuantificación de la intensidad de la señal de fluorescencia para p-C3G, medida con el programa ImageJ, en las plaquetas de cada genotipo y en las diferentes condiciones (n>3). wt: genotipo silvestre, tg: transgénico * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Para analizar si PKC participa en la activación de C3G, se analizó el efecto del PMA en la fosforilación de C3G en la tirosina 504 mediante un ensayo de inmunofluorescencia. Para ello, plaquetas de ratones tgC3G, tgC3GΔCat y sus correspondientes controles silvestres, previamente tratadas o no con bisindolilmaleimida 5 μM durante 5 minutos, se estimularon con PMA 2 μM durante 1 minuto en condiciones de agregación. A continuación, se fijaron las plaquetas y se incubaron con un anticuerpo primario anti-fosfo-C3G (Tyr504), seguido de incubación con un secundario anti-conejo marcado con Cy3, junto con Faloidina marcada con Oregon Green® 514 para teñir las estructuras del citoesqueleto (Tabla M-6). Previamente a este estudio, comprobamos que el anticuerpo anti-fosfo-C3G estaba reconociendo específicamente nuestra proteína. Para ello, realizamos un control, de su co-localización mediante un doble marcaje con el antisuero de conejo anti-C3G #1008 marcado con Cy5, que reconoce la proteína C3G completa y cuya especificidad ha sido ampliamente validada (Guerrero *et al* 1998; Guerrero *et al* 2004; Maia *et al.*, 2013) (Figura R-16A). En este caso, las imágenes de co-localización fueron tomadas en el microscopio confocal Leica SP8. Tal y como se observa en la Figura R-16B y R-16C, el PMA aumentó significativamente los niveles de fosforilación de C3G, en relación con su control sin estimular ($p<0,001$). Además, la intensidad de fluorescencia fue significativamente mayor en las plaquetas de ratones tgC3G o tgC3GΔCat que en sus controles de genotipo silvestre ($p<0,05$) (Figura R-16C), lo que está de acuerdo con una mayor expresión de C3G en estas plaquetas. Por otra parte, el tratamiento con bisindolilmaleimida inhibió completamente la fosforilación de C3G y C3GΔCat inducida por PMA, lo que indica una total dependencia de PKC en la fosforilación de C3G. Estos resultados apoyan la participación de C3G en la activación de Rap1 inducida por la ruta PMA-PKC. Sin embargo, el incremento en la fosforilación de C3GΔCat observado indicaría que dicha fosforilación no es suficiente para el efecto de C3G sobre la activación plaquetaria. Un dato curioso, que también se observa en el experimento de activación de la Figura R-15, es que las plaquetas transgénicas parecen ser más sensibles a la acción del bisindolilmaleimida que las plaquetas de genotipo silvestre.

5.9 ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE C3G EN LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN PLAQUETARIA REGULADAS POR ADP.

Los resultados anteriores sugieren que C3G activaría a Rap1 a través de una segunda ruta de activación por trombina, independiente de Ca^{2+} -CalDAG-GEFI y mediada por PKC. Por otra parte, también hemos observado una mayor respuesta de activación plaquetaria al ADP en ratones tgC3G. Estos dos resultados podrían estar relacionados, pues uno de los efectos de la trombina es el de inducir la desgranulación de los gránulos densos, con la consiguiente liberación de ADP que posteriormente interaccionaría con sus receptores de tipo P2Y1 y P2Y12 amplificando la respuesta (Kunapuli *et al* 2003). Basándonos en estos resultados hemos querido profundizar en el estudio de una posible participación de C3G en las vías de activación dependientes de ADP. Para ello hemos analizado tanto la activación como la agregación plaquetaria, en plaquetas de los distintos genotipos, utilizando inhibidores específicos de los dos tipos de receptores de ADP (Figura I-7 y Tabla M-5), como son clopidogrel/2-MesAMP (inhibidor de P2Y12) y MRS2179 (inhibidor de P2Y1). Previamente a este estudio hemos realizado una comprobación del efecto inhibitorio que tienen diferentes inhibidores de rutas plaquetarias, que se utilizarán a lo largo del trabajo (Tabla M-5), sobre la activación y agregación de plaquetas de ratones control (Figura R-17).

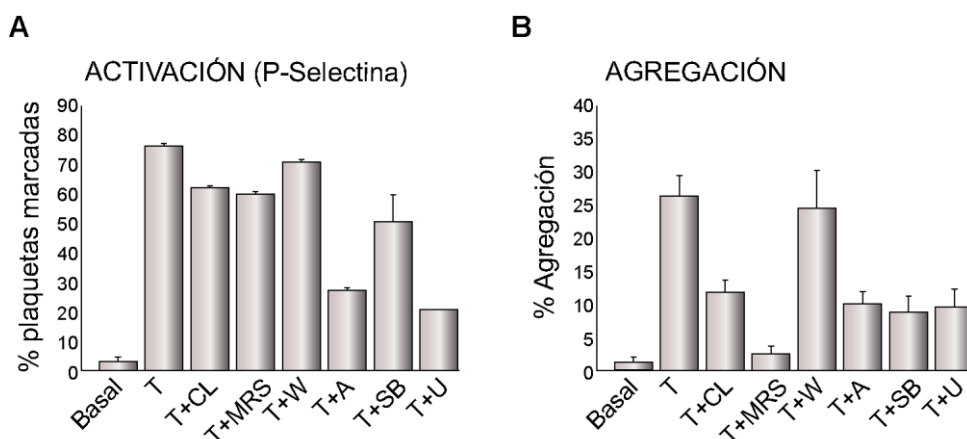


Figura R-17: Efecto de diferentes inhibidores de rutas de señalización plaquetarias sobre (A) activación o (B) agregación. Las plaquetas de animales control se pretrataron con los siguientes inhibidores: clopidogrel (100 μM), MRS2179 (100 μM), wortmanina (100 nM), aspirina (2 mg/ml), SB203580 (20 μM) y U0126 (20 μM) durante 5 min, y a continuación se estimularon con trombina (1 U/ml) durante (A) 15 min o (B) 5 min. Los histogramas representan la media \pm SEM (n=5) de los porcentajes de (A) activación plaquetaria (medida de la expresión en superficie celular de P-selectina y de (B) agregación plaquetaria. T: trombina, CL: clopidogrel, MRS: MRS2179, W: wortmanina, A: aspirina, SB; SB203580, U: U0126.

5.9.1 Estudio del efecto de inhibidores de los receptores de ADP sobre la activación plaquetaria.

Para el estudio del efecto del producto del transgén C3G en rutas de activación plaquetaria dependientes de ADP, se determinó la sensibilidad de las plaquetas transgénicas y silvestres a inhibidores de los receptores de ADP. Para ello se monitorizó, mediante citometría de flujo, tanto la expresión de P-selectina en superficie (Figura R-18A), como la activación de la integrina plaquetaria $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (Figura R-18B), de forma similar a lo detallado en el apartado 5.4.1, en presencia de clopidogrel, un inhibidor del receptor P2Y₁₂ y MRS2179, inhibidor del receptor P2Y₁. Como agonistas se utilizaron tanto ADP como trombina que, como hemos comentado, activa indirectamente los receptores de ADP a partir de la desgranulación de los gránulos densos. Los porcentajes de inhibición se calcularon dividiendo los valores de activación con agonista más inhibidor, entre los valores de activación solo con el agonista. Como muestra la Figura R-18, las plaquetas de ratones transgénicos C3G, estimuladas con trombina mostraron unos porcentajes de inhibición por clopidogrel mayores que sus controles de genotipo silvestre, mientras que las plaquetas de ratones transgénicos C3G Δ Cat no mostraron diferencias significativas con respecto a sus controles silvestres.

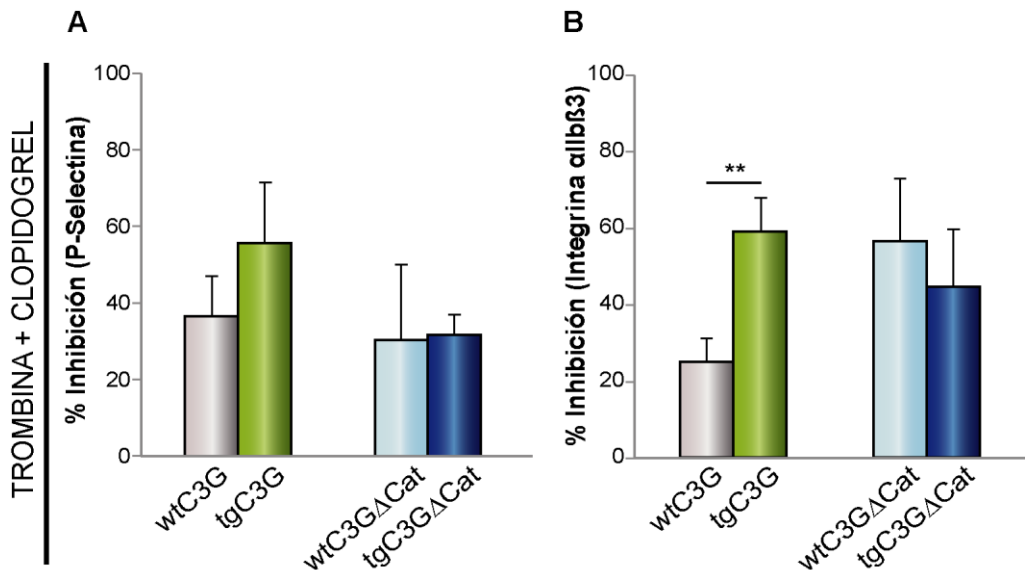


Figura R-18. Las plaquetas de ratones transgénicos C3G son más sensibles al tratamiento con clopidogrel en respuesta a la trombina. Las plaquetas de ratones tgC3G, tgC3G Δ Cat y sus correspondientes controles fueron pretratadas con clopidogrel (100 μ M) durante 5 min, y después estimuladas con trombina (1 U/ml) durante 15 min. Los histogramas representan la media \pm SEM (n=5) de los porcentajes de inhibición de la activación plaquetaria (medida de la expresión en superficie celular de P-selectina (A) o de integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ activada (B), medida por unión de fibrinógeno marcado con Alexa Fluor 488) con respecto a los valores sin inhibidor. **p<0,01; los valores son relativos a su control correspondiente para cada genotipo. wt: genotipo silvestre, tg: transgénico.

Esta mayor sensibilidad de las plaquetas transgénicas al clopidogrel indicaría que C3G estaría participando en las rutas de señalización plaquetaria dependientes del receptor de ADP, P2Y12.

Se observó la misma tendencia cuando se estimularon las plaquetas directamente con ADP (Figura R-19). Así, las plaquetas de ratones transgénicos C3G mostraron porcentajes de inhibición en presencia de clopidogrel significativamente mayores que sus respectivos controles de tipo silvestre. Por el contrario, las plaquetas de los ratones transgénicos C3GΔCat mostraron porcentajes de inhibición significativamente menores que su control correspondiente (Figura R-19). En este caso sólo se monitorizó el efecto sobre la activación de la integrina plaquetaria, debido al débil efecto de este agonista sobre la desgranulación (ver Figura R-8). Todos estos resultados sugieren fuertemente que C3G participa en la ruta ADP-P2Y12, la cual se sabe que está implicada en la activación de Rap1 a través de PI3K (Woulfe *et al* 2002).

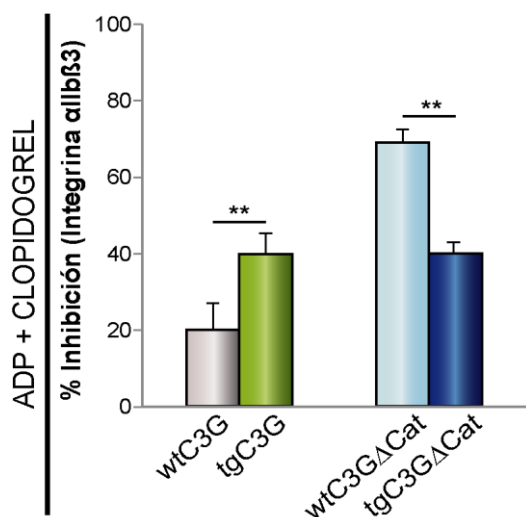


Figura R-19. Las plaquetas de ratones tgC3G son más sensibles al tratamiento con clopidogrel cuando son activadas por ADP, mientras que las plaquetas C3GΔCat muestran mayor resistencia. Las plaquetas de ratones tgC3G, tgC3GΔCat y sus correspondientes controles fueron pretratadas con clopidogrel (100 μM) durante 5 min, y después estimuladas con ADP (10 μM) – Fibrinógeno Alexa-Fluor®488 durante 15 min. Los histogramas representan la media ± SEM (n=8) de los porcentajes de inhibición de la activación plaquetaria (medida de la de integrina αIIbβ3 activada). ***p*<0,01. Los valores son relativos a su control correspondiente para cada genotipo. wt: genotipo silvestre, tg: transgénico.

En cuanto a la implicación de C3G en la ruta de activación ADP-P2Y1, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de inhibición de los niveles de desgranulación entre plaquetas tgC3G y tgC3GΔCat y sus respectivos controles de genotipo silvestre activadas con trombina en presencia de MRS2179 (Figura R-20A). En cambio, sí se observan diferencias significativas en cuanto a la inhibición de la activación de la integrina αIIbβ3 entre las plaquetas

de ratones tgC3G y su control (Figura R-20B). Este resultado sugiere una menor contribución de C3G en la ruta ADP-P2Y1, donde C3G participaría en la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta3$.

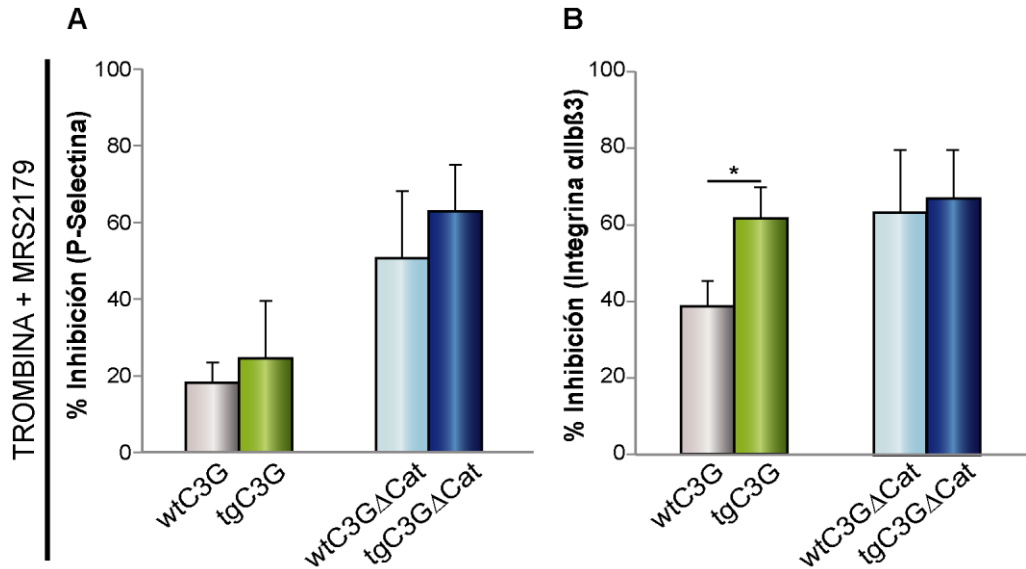


Figura R-20. El transgén C3G tiene una modesta participación en la ruta ADP-P2Y1. Las plaquetas de ratones tgC3G, tgC3G Δ Cat y sus correspondientes controles fueron pretratadas con MRS2179 (100 μ M) durante 5 min, y después estimuladas con trombina (1 U/ml) durante 15 min. Los histogramas representan la media \pm SEM (n=6) de los porcentajes de inhibición de la activación plaquetaria (medida de la expresión en superficie celular de P-selectina o de integrina $\alpha\text{IIb}\beta3$ activada) con respecto a los valores sin inhibidor. *p<0,05. Los valores son relativos a su control correspondiente para cada genotipo. wt: genotipo silvestre, tg: transgénico.

Por otra parte, no se encontraron diferencias en la inhibición por MRS2179 entre plaquetas de los distintos genotipos estimuladas con ADP (Figura R-21). Una posible razón es el potente efecto de este inhibidor, cercano al 100%, sobre la activación directa con ADP.

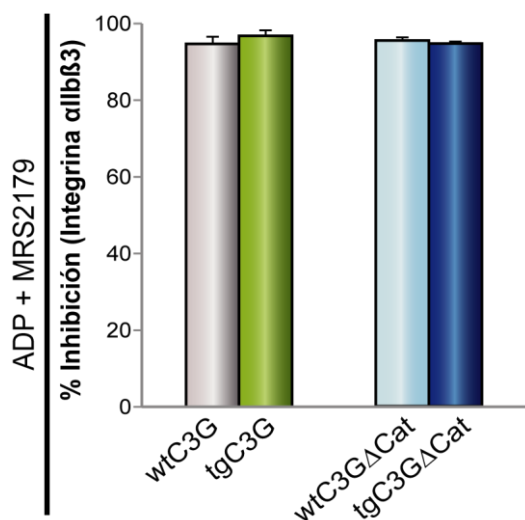


Figura R-21. MRS2179 inhibe drásticamente la activación de la integrina plaquetaria por la ruta ADP-P2Y1. Las plaquetas de ratones tgC3G, tgC3G Δ Cat y sus correspondientes controles fueron pretratadas con MRS2179 (100 μM) durante 5 min, y después estimuladas con ADP (10 μM) – Fibrinógeno Alexa-Fluor[®]488 durante 15 min. Los histogramas representan la media \pm SEM (n=9) de los porcentajes de inhibición de la activación plaquetaria (medida de la de integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activada). Los valores son relativos a su control correspondiente para cada genotipo. wt: genotipo silvestre, tg: transgénico.

5.9.2 Estudio del efecto de inhibidores de los receptores de ADP sobre la agregación plaquetaria.

Para seguir profundizando en la participación de C3G en la ruta de activación del ADP realizamos un estudio de agregación plaquetaria en plaquetas de los distintos genotipos, pretratadas o no con clopidogrel o MRS2179, y utilizando trombina como estímulo para la liberación del ADP endógeno, ya que el tratamiento con ADP, que es un agonista débil, no indujo niveles de agregación suficientes para permitir evaluar las diferencias en presencia o ausencia de los inhibidores (ver Figura R-10). En estos experimentos, la agregación se monitorizó por citometría de flujo mediante un novedoso método (De Cuyper *et al* 2013), descrito en Materiales y Métodos (Sección 3. 9. 2) a 5 y 10 minutos de estimulación.

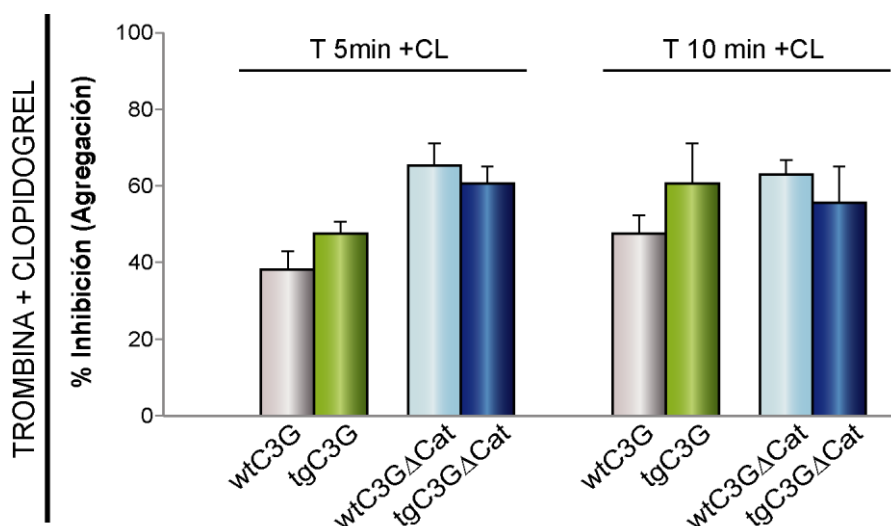


Figura R-22. El clopidogrel inhibe la agregación de plaquetas tgC3G estimuladas con trombina en mayor porcentaje que la de plaquetas silvestres, mientras que las plaquetas tgC3GΔCat muestran la tendencia opuesta. Las plaquetas de ratones tgC3G, tgC3GΔCat y sus correspondientes controles fueron pretratadas con clopidogrel (100 μ M) durante 5 min, y después estimuladas con trombina (1U/ml). Los histogramas representan la media \pm SEM (n=5) de los porcentajes de inhibición de la agregación plaquetaria. Los valores son relativos a su control correspondiente para cada genotipo. wt: genotipo silvestre, tg: transgénico, T: trombina, CL: clopidogrel.

Aunque los resultados no son significativos, la Figura R-22 muestra que las plaquetas de ratones tgC3G mostraron la misma tendencia observada en el experimento de activación (Figura R-18), es decir, una mayor sensibilidad al clopidogrel en comparación con sus correspondientes controles de tipo silvestre, sobre todo, a los 10 minutos de la adición del agonista. En cambio, en las plaquetas de los ratones tgC3GΔCat se observó la tendencia contraria, es decir, estas plaquetas mostraron una ligera mayor resistencia a la inhibición por clopidogrel que sus correspondientes controles de tipo silvestre. Estos datos apoyan los resultados obtenidos en los experimentos de activación plaquetaria mostrados en las Figuras R-18 y R-19, e indicarían que C3G participa en las rutas de señalización plaquetaria iniciadas por la unión del ADP a su receptor P2Y₁₂, que conducen a la activación y agregación. El hecho de que el mutante C3GΔCat sea más insensible a la acción del clopidogrel indicaría que el ADP no actúa a través de esta proteína, lo que a su vez sugiere que la función de C3G en las rutas de señalización ADP-P2Y₁₂ es dependiente de su dominio catalítico y posiblemente involucra la activación de Rap1.

No hemos observado diferencias en la inhibición de la agregación en plaquetas pretratadas con MRS2179 tal y como se observa en la Figura R-23. Este resultado, junto con los resultados observados en la Figura R-21 apoyarían la idea de que C3G no juega un papel

relevante en la ruta de señalización plaquetaria ADP-P2Y₁, aunque los resultados no son concluyentes, dado los elevados niveles de inhibición.

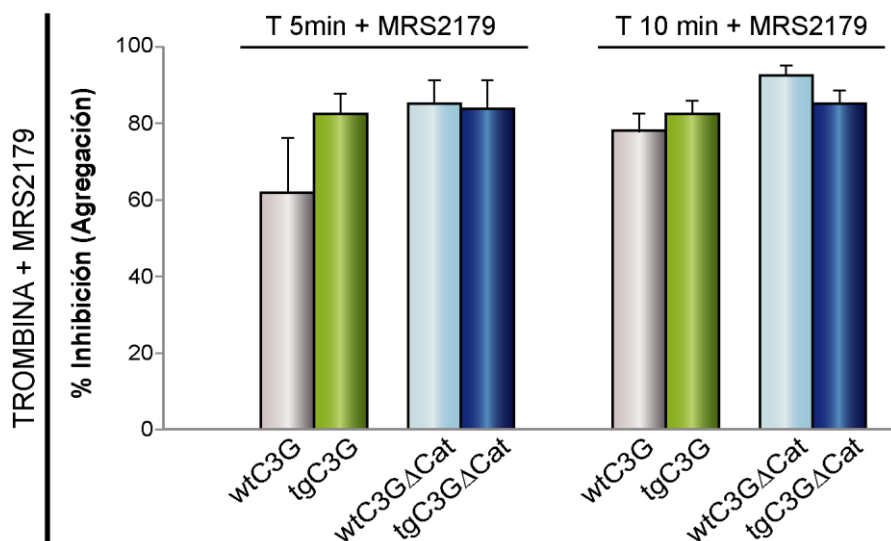


Figura R-23. La inhibición de la agregación por MRS2179 no se ve afectada por la expresión de los transgenes C3G y C3GΔCat. Las plaquetas de ratones tgC3G, tgC3GΔCat y sus correspondientes controles fueron pretratadas con MRS2179 (100 μM) durante 5 min, y después estimuladas con trombina (1 U/ml). Los histogramas representan la media ± SEM (n=8) de los porcentajes de inhibición de la agregación plaquetaria .wt: genotipo silvestre, tg: transgénico, T: trombina.

5.9.3 C3G ESTÁ INVOLUCRADO EN LA RUTA P2Y₁₂-PI3K QUE CONDUCE A LA ACTIVACIÓN DE Rap1

Los resultados mostrados en las Figuras R-13 y R-14 indican que C3G participa en la ruta trombina-PKC que conduce a la activación de Rap1 en plaquetas, y que C3GΔCat actuaría como un dominante negativo de la activación de Rap1. Por otra parte, se sabe que el ADP, a través de receptores P2Y₁₂, activa Rap1 por una ruta mediada por PI3K (Woulfe *et al* 2002). Para determinar si C3G es el GEF implicado en la activación de Rap1 por esta vía, se realizó un ensayo de activación de Rap1 en plaquetas estimuladas con trombina, previamente tratadas con 2-MesAMP (inhibidor del receptor P2Y₁₂) y wortmanina (Inhibidor de PI3K).

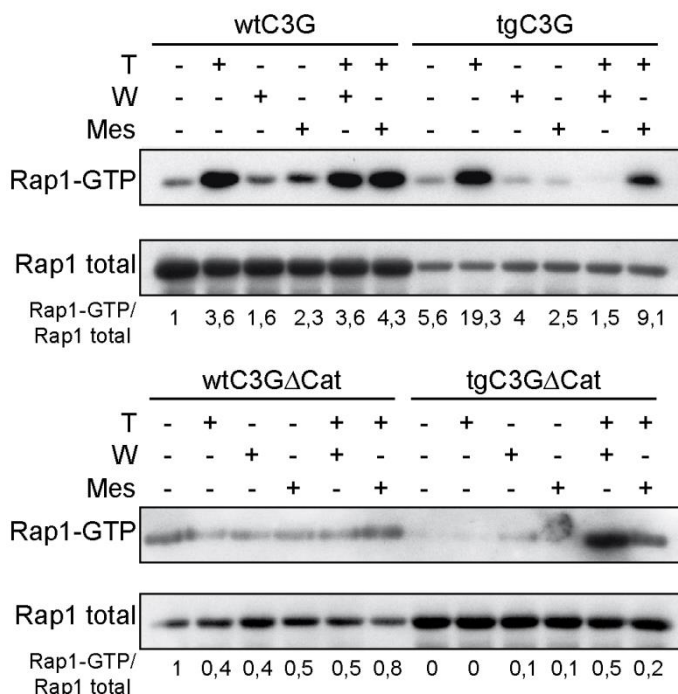


Figura R-24. C3G participa en la activación de Rap1 por la ruta de señalización P2Y12-PI3K. Las plaquetas de animales tgC3G, tgC3G Δ Cat y sus respectivos controles fueron estimuladas o no con trombina (1U/ml) durante 1 min en presencia o no de 100 nM de wortmanina o 50 μ M de 2-MesAMP durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente las plaquetas se lisaron y se aisló la forma de Rap1 unida a GTP mediante su interacción con GST-RalGDS-RBD, y posterior detección por Western Blot con anticuerpos anti-Rap1. wt: genotipo silvestre, tg: transgénico, T: trombina, W: wortmanina, Mes: 2-MesAMP. Los valores están normalizados frente a los controles silvestres sin estimular. Se muestran los valores relativos de la relación Rap-GTP/Rap1 total.

El resultado muestra, de nuevo, una mayor activación de Rap1 en plaquetas tgC3G estimuladas con trombina, que en plaquetas silvestres (Figura R-24). Sorprendentemente, la activación de Rap1 en plaquetas silvestres no se vio afectada por los inhibidores 2-MesAMP y wortmanina. En cambio, en las plaquetas tgC3G la activación de Rap1 fue completamente inhibida por la wortmanina y parcialmente por el 2-MesAMP. Por otra parte, y en concordancia con resultados anteriores, las plaquetas de los ratones transgénicos C3G Δ Cat, no mostraron apenas activación de Rap1 en respuesta a trombina, corroborándose la acción dominante negativa de este mutante. De nuevo, ni wortmanina ni 2-MesAMP mostraron ninguna acción inhibitoria sobre la activación de Rap1 en estas plaquetas tgC3G Δ Cat.

Todos estos resultados sugieren que C3G es un mediador de la activación de Rap1 por ADP a través de la ruta P2Y12-PI3K.

Un hecho curioso que observamos en estos experimentos fue una menor abundancia de proteína total en el caso de las plaquetas tgC3G con respecto a su control (medido como

cantidad de Rap1 total) y una mayor abundancia en el caso de las tgC3GΔCat, a pesar de partir del mismo volumen de sangre (recordemos que no existen diferencias en el recuento plaquetario entre los diferentes genotipos). Una posible explicación es que las plaquetas tgC3G formen coágulos con mucha facilidad, con lo cual se obtiene menos PRP activable. En el caso de las plaquetas tgC3GΔCat la explicación sería a la inversa.

También se realizaron estudios de activación y agregación en plaquetas tratadas con wortmanina pero no se obtuvieron resultados significativos (datos no mostrados).

5.10 C3G REGULA LA SÍNTESIS DE TROMBOXANO A₂

Una de las consecuencias de la activación de las plaquetas es la producción de tromboxano A₂ (TXA₂). Al igual que el ADP, el TXA₂ es un importante agonista plaquetario que actúa amplificando la señal de activación mediante su unión a receptores específicos. Para estudiar si C3G está implicado en la ruta de síntesis del TXA₂, hemos realizado tres aproximaciones experimentales: (i) ensayos de activación y agregación en presencia de aspirina, un inhibidor de la ruta de síntesis de TXA₂, (ii) análisis de la producción de TXA₂ en las diferentes líneas de ratones transgénicos y (iii) estudio de la inhibición de la fosforilación de C3G por aspirina.

5.10.1 Estudio del efecto de la aspirina sobre la activación plaquetaria regulada por C3G.

Para analizar el efecto de la aspirina en plaquetas procedentes de las diferentes líneas de ratones transgénicos se monitorizó, mediante citometría de flujo, tanto la expresión de P-selectina en la superficie plaquetaria, como la activación de la integrina plaquetaria αIIbβ3 utilizando como agonistas la trombina y el ADP. Para ello, las plaquetas fueron pretratadas durante 5 minutos con 2 mg/ml de aspirina y posteriormente estimuladas con los agonistas.

En cuanto a la expresión de P-selectina inducida por trombina, de nuevo, las plaquetas tgC3G fueron significativamente más sensibles a la inhibición por aspirina que sus respectivos controles (Figura R-25A). Esto no se observó en las plaquetas de ratones tgC3GΔCat, las cuales, incluso mostraron la tendencia contraria. En cuanto a la detección de la integrina αIIbβ3 activada, ambas plaquetas transgénicas mostraron una tendencia a una mayor sensibilidad a la aspirina, si bien estos resultados no fueron estadísticamente significativos (Figura R-25B).

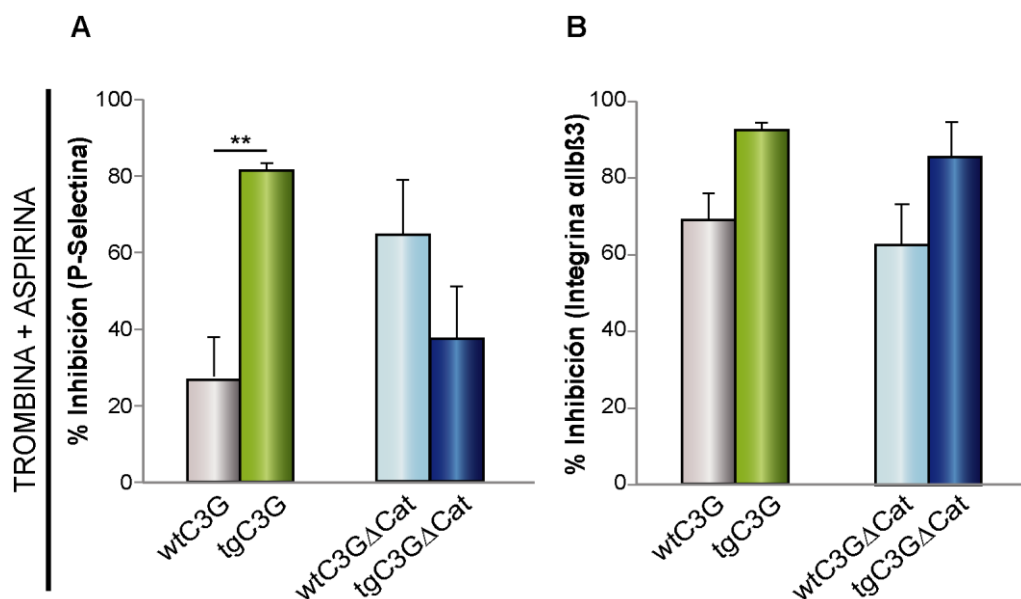


Figura R-25. Las plaquetas de ratones tgC3G y tgC3GΔCat activadas con trombina muestran diferente sensibilidad al pretratamiento con aspirina. Las plaquetas de ratones tgC3G, tgC3GΔCat y sus correspondientes controles silvestres fueron pretratadas con 2 mg/ml de aspirina durante 5 min, y después estimuladas con trombina (1 U/ml). Los histogramas representan la media ± SEM (n=6) de los porcentajes de inhibición de la expresión de P-selectina (A) o de la integrina αIIbβ3 activada (B). Los valores son el resultado de dividir el valor de activación con trombina entre el valor de activación con trombina + aspirina. **p<0,01 tgC3G vs wtC3G. wt: genotipo silvestre, tg: transgénico.

Se monitorizó también el efecto de la aspirina en plaquetas activadas por ADP, mediante el ensayo de activación de la integrina αIIbβ3. Al igual que en el caso de la trombina, las plaquetas tgC3G mostraron un porcentaje de inhibición significativamente mayor que las correspondientes plaquetas de hermanos silvestres. En cambio, las plaquetas tgC3GΔCat no mostraron diferencias significativas con respecto a sus controles (Figura R-26).

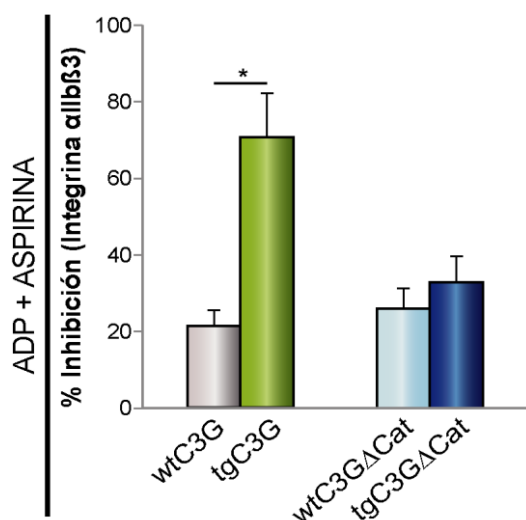


Figura R-26. Las plaquetas de ratones tgC3G son más sensibles al pretratamiento con aspirina previo a la activación por ADP. Las plaquetas de ratones tgC3G, tgC3GΔCat o silvestres fueron pretratadas con 2 mg/ml de aspirina durante 5 min, y después estimuladas con ADP (10 μM) – Fibrinógeno ALEXA-Fluor®488. Los histogramas representan la media ± SEM (n=5) de los porcentajes de inhibición de la activación plaquetaria (medida de la integrina αIIbβ3 activada). Los valores son el resultado de dividir el valor de activación con ADP entre el valor de activación con ADP + aspirina. * $p < 0,05$. wt: genotipo silvestre, tg: transgénico.

Estos resultados indican que C3G estaría participando en las acciones del TXA_2 inducidas por trombina o ADP a través de un mecanismo dependiente de su dominio GEF, lo que probablemente implica la activación de Rap1.

5.10.2 Estudio del efecto de la aspirina sobre la agregación plaquetaria regulada por C3G.

Para corroborar los resultados obtenidos en los ensayos de activación plaquetaria utilizando aspirina como inhibidor, realizamos un estudio de agregación plaquetaria bajo las mismas condiciones experimentales, usando trombina como agonista. La agregación se monitorizó mediante citometría de flujo (ver apartado 3.9.2 de Materiales y Métodos).

En la Figura R-27 se observa que, de forma similar a lo que ocurre en los experimentos de activación, la agregación, inducida por trombina, de plaquetas tgC3G mostró una tendencia hacia una mayor sensibilidad a la inhibición por aspirina que la agregación de las plaquetas silvestres, sobre todo a los 5 minutos de estimulación. En cambio, las plaquetas tgC3GΔCat se comportaron prácticamente igual que sus controles.

Todos estos resultados sugieren, una vez más, que C3G es un mediador del efecto del TXA₂ en la activación y agregación plaquetaria a través de su función GEF sobre Rap1. Existen dos posibilidades: (i) que C3G participe directamente en la ruta de síntesis del TXA₂, o (ii) que C3G sea un mediador de la ruta activada por TXA₂. De hecho, se sabe que el TXA₂ activa a Rap1, aunque el GEF responsable no se ha determinado (Hackeng *et al* 2000b; Relou *et al* 2003).

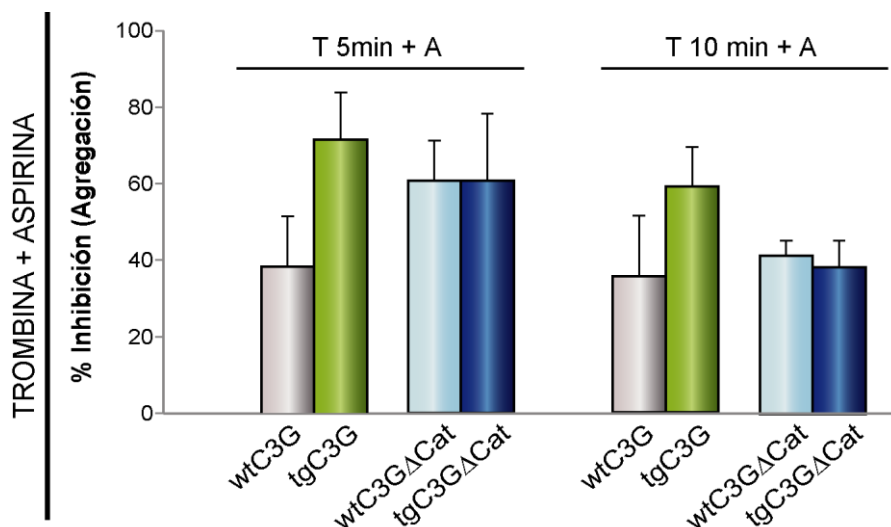


Figura R-27. El pretratamiento con aspirina induce una mayor inhibición de la agregación de plaquetas de ratones tgC3G estimuladas con trombina que las de plaquetas silvestres. Las plaquetas de ratones tgC3G, tgC3GΔCat o control fueron pretratadas con 2 mg/ml de aspirina durante 5 min, y después estimuladas con trombina (1 U/ml) durante 5 o 10 min. Los histogramas representan la media ± SEM (n=4) del porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria (medida por citometría de flujo). Los valores son el resultado de dividir el valor de activación con trombina entre el valor de activación con Trombina + aspirina. wt: genotipo silvestre, tg: transgénico, T: trombina, A: aspirina.

5.10.3 Análisis de la producción de Tromboxano A₂ en las plaquetas de ratones tgC3G y tgC3GΔCat.

Para comprobar si C3G participa en la ruta de formación del TXA₂, una de las posibilidades sugeridas por los experimentos de las Figuras R-25 a R-27, hemos analizado, mediante HPLC/espectrometría de masas, los niveles de tromboxano B₂ (TXB₂), la forma estable del tromboxano, liberado por las plaquetas. Para ello se han utilizado plaquetas de ratones tgC3G, tgC3GΔCat y de sus correspondientes controles de tipo silvestre, estimuladas previamente con trombina. Sorprendentemente, los niveles de TXB₂ inducidos por trombina fueron significativamente menores en las plaquetas de los ratones tgC3G, en

comparación con sus correspondientes controles de genotipo silvestre (Figura R-28), indicando que C3G estaría regulando negativamente la vía de síntesis. Las plaquetas de ratones tgC3GΔCat estimuladas con trombina también produjeron menos TXB₂ que sus controles, si bien, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Se sabe que Rap1 es un inhibidor de p38 MAPK en muchos tipos celulares (Stork 2003; Stork *et al* 2005). Por otra parte p38 MAPK activa a la cPLA₂ en la ruta de síntesis del TXA₂ (Hackeng *et al* 2000b; Relou *et al* 2003). Por tanto, una explicación de los menores niveles de TXA₂ producidos por las plaquetas tgC3G es que la ruta trombina-C3G-Rap1 esté inhibiendo la síntesis de TXA₂ a nivel de p38 MAPK.

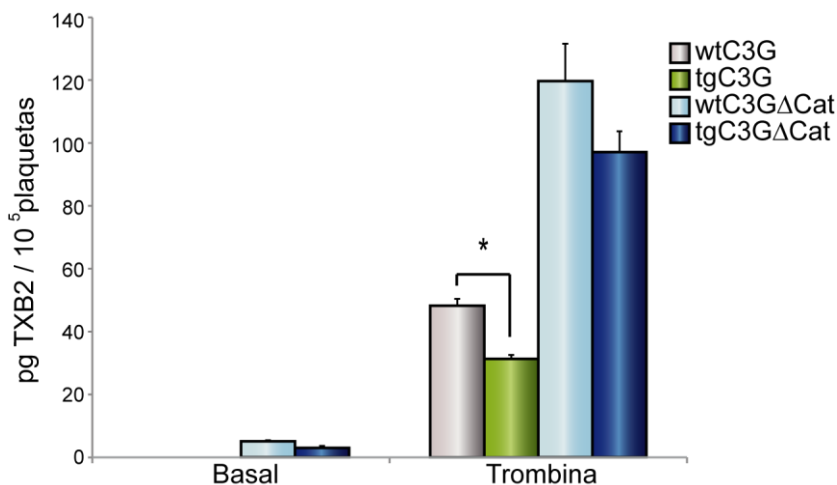


Figura R-28. El transgén C3G regula negativamente la producción de TXB₂ en plaquetas estimuladas con trombina. Plaquetas purificadas de ratones de los distintos genotipos se estimularon con trombina (1U/ml) durante 3,5 min a 37°C bajo condiciones de agitación. El TXA₂ secretado fue detectado mediante HPLC/espectrometría de masas. Los histogramas representan la media ± SEM (n=4) de los picogramos (pg) de TXB₂ por cada 10⁵ plaquetas. **p*<0,05; wt: genotipo silvestre, tg: transgénico.

La mayor sensibilidad a la aspirina mostrada por las plaquetas tgC3G estimuladas por trombina y ADP podría indicar un mecanismo sinérgico entre la aspirina y la ruta C3G-Rap1 en la inhibición del TXA₂.

5.10.4 El TXA₂ es un mediador de la activación de C3G inducida por trombina.

Para determinar si C3G participa en la ruta de señalización del TXA₂ determinamos, mediante inmunofluorescencia, la fosforilación de C3G en el residuo Tyr504, como una medida de su activación, en plaquetas de los distintos genotipos activadas con trombina en presencia o no de aspirina.

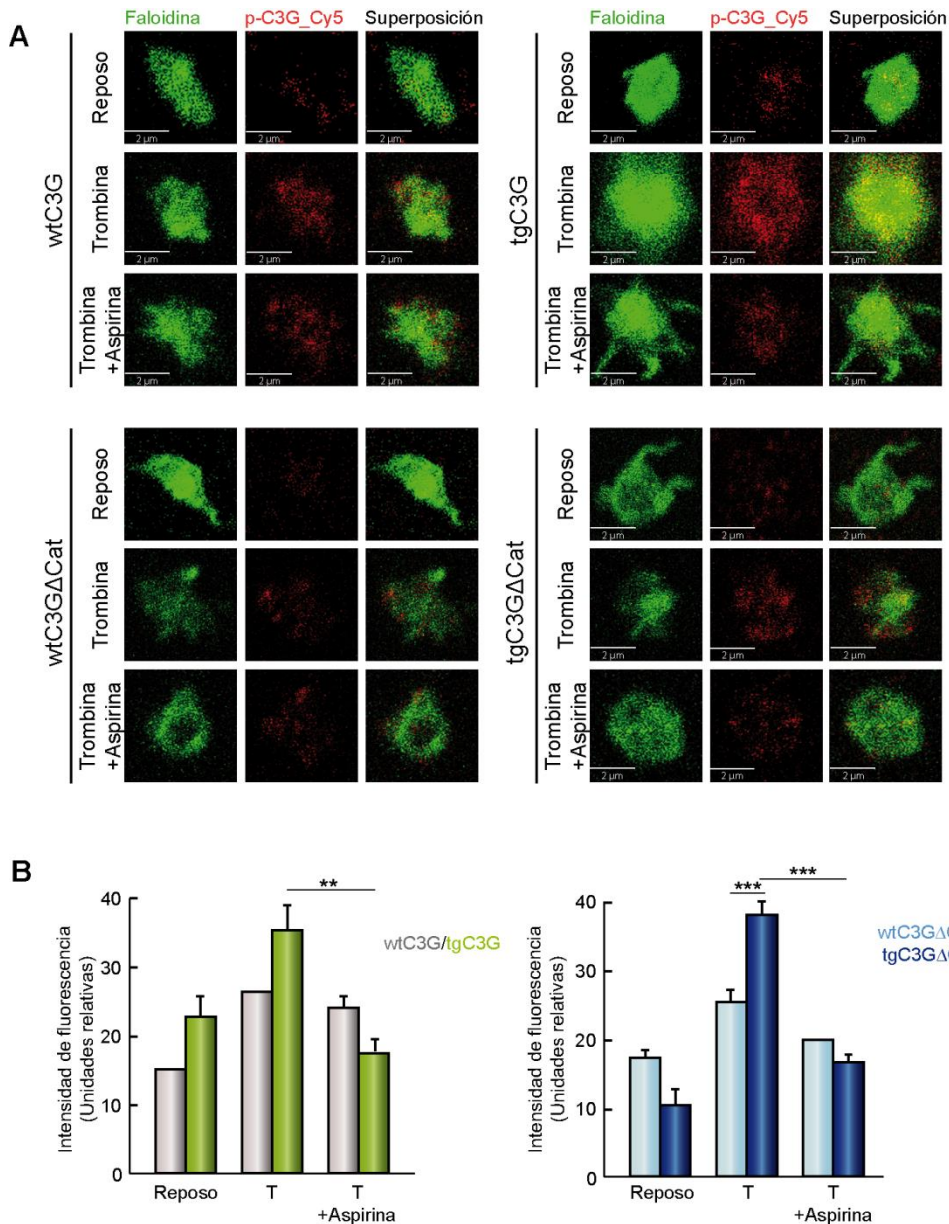


Figura R-29: La fosforilación de los transgenes C3G y C3GΔCat se ve afectada por la inhibición de la síntesis deTXA₂. (A). Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal muestran plaquetas de ratones tgC3G, tgC3GΔCat y sus correspondientes controles, doblemente marcadas con Faloidina (verde) y anti-pTyr504-C3G_Cy5 (rojo). Las imágenes muestran una plaqueta representativa de cada genotipo con los diferentes tratamientos: reposo, trombina (0,5 U/ml) y trombina + aspirina (2 mg/ml). Las imágenes fueron tomadas con los mismos tiempos de exposición. Barra=2 μm. (B). Los histogramas muestran la media ± SEM (n>5) de la intensidad de fluorescencia (unidades relativas) de p-C3G, cuantificada mediante el programa ImageJ y normalizada frente a la fluorescencia de la actina (Faloidina). ***p*<0,01, ****p*<0,001. T: trombina.

Para ello, plaquetas de ratones tgC3G, tgC3G Δ Cat y sus correspondientes controles silvestres, previamente tratadas o no con 2 mg/ml de aspirina durante 5 minutos, se estimularon con trombina 0,5 U/ml durante 1 minuto en condiciones de agregación. A continuación, se fijaron las plaquetas y se incubaron con los anticuerpos correspondientes como se detalla en el apartado 1.8 de esta sección. Los resultados de la Figura R-29 muestran que los niveles de pTyr504-C3G fueron mayores en ambas plaquetas transgénicas con respecto a sus controles, probablemente reflejo de la mayor expresión de C3G en estas plaquetas. Por otra parte, el pretratamiento con aspirina disminuyó la fosforilación de C3G inducida por trombina. Esta disminución fue significativa en ambas plaquetas transgénicas, lo que sugiere que el TXA₂ es un mediador de la activación de C3G inducida por trombina.

5.11 IMPLICACIÓN DE C3G EN LAS RUTAS DE ERK1/2 Y DE p38 MAPK

La participación de las MAPK en la función plaquetaria es controversial. Algunos estudios sugieren que tanto ERK1/2 como p38 MAPK son esenciales para la agregación plaquetaria (Li *et al* 2001; Roger *et al* 2004), la secreción de gránulos (Oury *et al* 2002; Roger *et al* 2004), la síntesis del TXA₂ (Garcia *et al* 2005; Shankar *et al* 2006) y la formación del trombo (Sakurai *et al* 2004), mientras que otros indican que estas kinasas no contribuyen a ninguna de las respuestas plaquetarias (Borsch-Haubold *et al* 1996; McNicol *et al* 2003). Nosotros hemos podido comprobar que inhibidores específicos de estas MAPK tales como U0126 (inhibidor de ERK1/2) y SB203580 (inhibidor de p38 MAPK) afectan a la activación y agregación plaquetaria (Figura R-17).

Por otra parte, los resultados obtenidos en este trabajo indican que C3G está implicado en la mayoría de los procesos regulados por estas MAPK, tales como activación y agregación plaquetaria y síntesis de TXA₂. Además, C3G está también implicado en la secreción de los gránulos α (Martin-Granado *et al* 2017). Por tanto, nos planteamos si C3G podría actuar a través de la activación de estas MAPK en plaquetas. Para comprobar esta hipótesis hemos realizado estudios de activación y agregación plaquetaria utilizando los inhibidores de MAPK, U0126 y SB203580.

5.11.1 Estudio del efecto de la inhibición de ERK1/2 y p38 MAPK sobre la activación de las plaquetas tgC3G y tgC3GΔCat.

Para estudiar la implicación de C3G en las vías de las MAPK, ERK1/2 y p38 MAPK, se trataron las plaquetas con sus inhibidores, U0126 y SB203580, respectivamente, previamente a la estimulación con trombina durante 1 minuto, y se monitorizó la activación plaquetaria mediante la expresión de P-selectina en superficie y la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$.

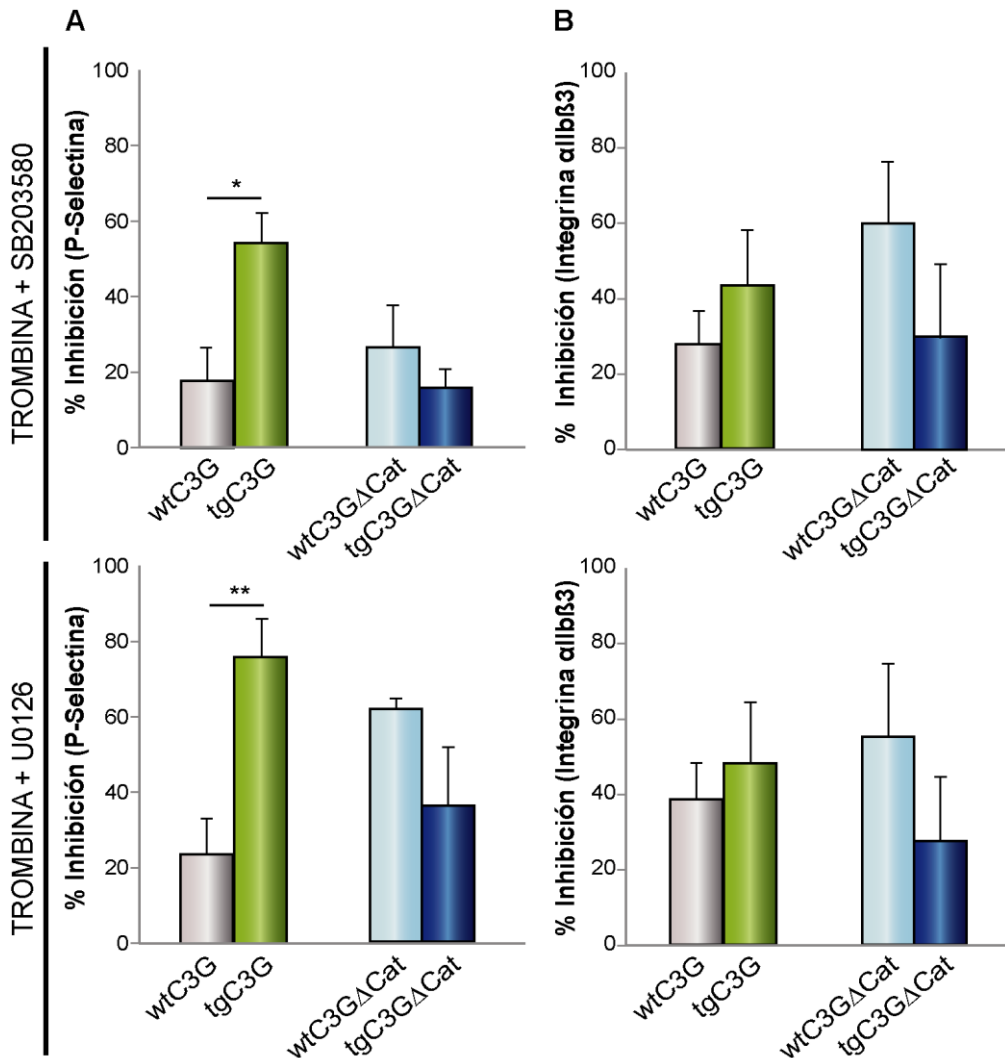


Figura R-30. Las plaquetas tgC3G son más sensibles a los inhibidores de ERK1/2 y p38 MAPK, U0126 y SB203580, en respuesta a trombina. Las plaquetas de ratones tgC3G, tgC3GΔCat y

sus controles correspondientes fueron pretratadas con SB203580 (20 μ M) y U0126 (20 μ M) durante 5 min y después estimuladas con trombina (1 U/ml). Los histogramas representan la media \pm SEM (n=6 para SB203580 y n=5 para U0126) de los porcentajes de inhibición de la expresión de P-selectina (A) o de integrina α IIb β 3 activada (B). Los valores son el resultado de dividir el valor de activación con trombina entre el valor de activación con trombina + inhibidor. * p <0,05, ** p <0,01. wt: genotipo silvestre, tg: transgénico.

En la Figura R-30 se muestra el porcentaje de inhibición de la activación plaquetaria en presencia de los inhibidores con respecto a la activación en ausencia de inhibidores. Las plaquetas tgC3G fueron significativamente más sensibles a ambos inhibidores, en cuanto a la expresión de P-selectina, que sus correspondientes controles de tipo silvestre (Figura R-30A). La misma tendencia se observó en cuanto a la activación de la integrina, aunque en este caso las diferencias no son significativas (Figura R-30B). En cambio, las plaquetas tgC3G Δ Cat no muestran porcentajes de inhibición significativamente diferentes con respecto a sus controles, y en todo caso, muestran la tendencia contraria, es decir, una mayor resistencia a la acción de los inhibidores.

Resultados similares se obtuvieron al estimular las plaquetas con ADP en presencia o no de los inhibidores U0126 y SB203580, si bien las diferencias entre plaquetas transgénicas y sus controles no fueron tan marcadas (Figura R-31).

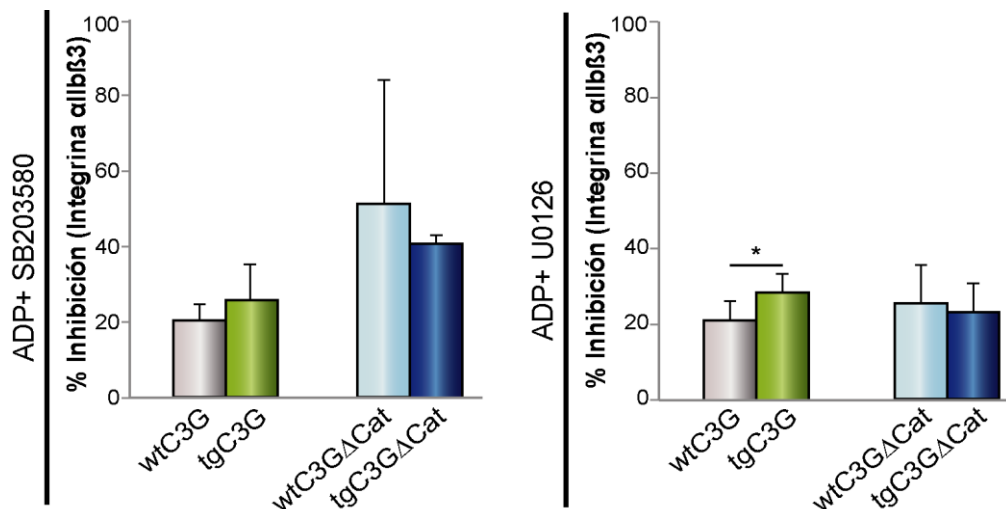


Figura R-31. Las plaquetas tgC3G son más sensibles al tratamiento con SB203580 y U0126 en respuesta a la activación por ADP. Las plaquetas de ratones tgC3G, tgC3G Δ Cat o silvestres fueron pretratadas con SB203580 (20 μ M) y U0126 (20 μ M) durante 5 min, y después estimuladas con ADP (10 μ M) – Fibrinógeno ALEXA-Fluor[®]488. Los histogramas representan la media \pm SEM (n=5) de los porcentajes de inhibición de la activación plaquetaria (medida de la de integrina α IIb β 3 activada). Los valores son el resultado de dividir el valor de activación con ADP entre el valor de activación con ADP + inhibidor. * p <0,05. wt: genotipo silvestre, tg: transgénico.

Estos resultados sugieren la participación de C3G en las rutas de ERK1/2 y p38 MAPK plaquetarias, estimuladas por trombina o ADP.

5.11.2 Estudio del efecto de la inhibición de ERK1/2 y p38 MAPK sobre la agregación de las plaquetas tgC3G y tgC3GΔCat.

La participación de C3G en las rutas de ERK1/2 y p38 MAPK también se analizó mediante estudios de agregación plaquetaria en presencia de los inhibidores U0126 y SB203580 y utilizando trombina como agonista.

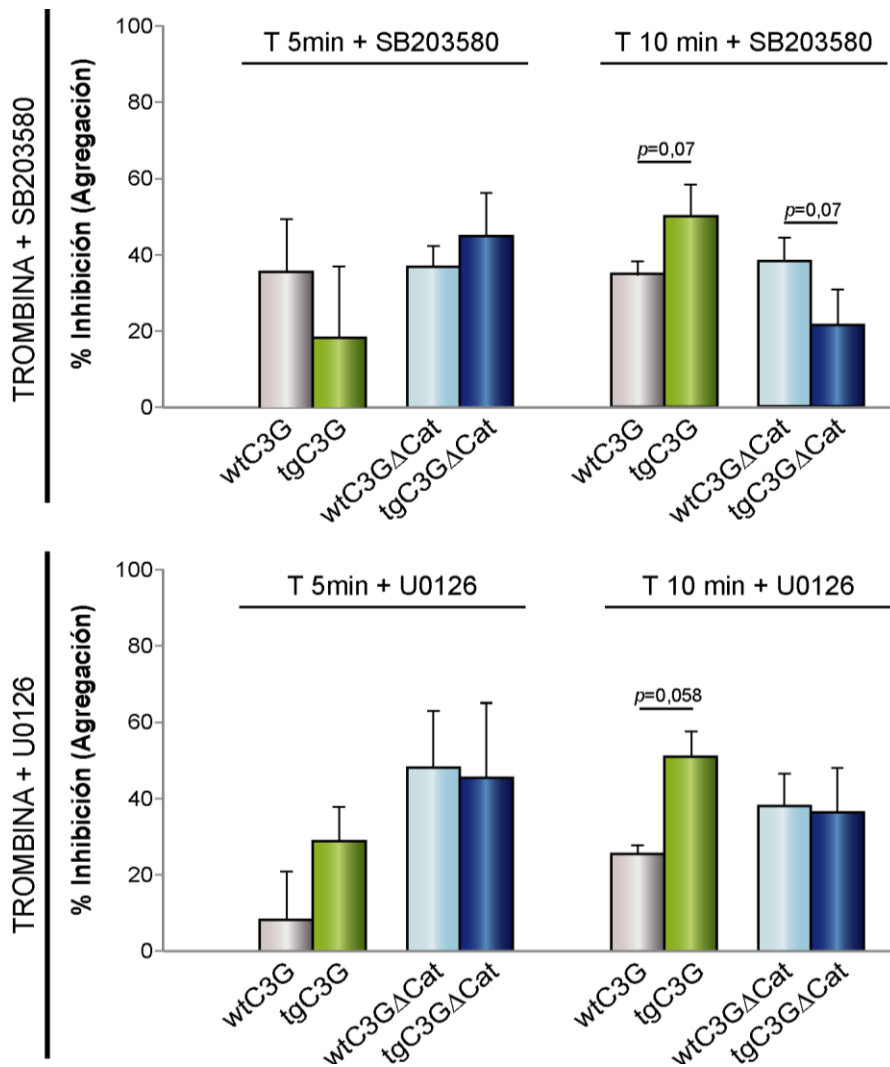


Figura R-32. La agregación de plaquetas tgC3G estimuladas con trombina es más sensible a la inhibición por SB203580 y U0126. Las plaquetas tgC3G, tgC3GΔCat o sus correspondientes controles fueron pretratadas con SB203580 (20 μM) o U0126 (20 μM) durante 5 min, y después estimuladas con trombina (1 U/ml). Los histogramas representan la media ± SEM (n=4) de los porcentajes de inhibición de la agregación plaquetaria (medida por citometría de flujo). Los valores son el resultado de dividir el valor de agregación con trombina entre el valor de agregación con trombina + inhibidor. wt: genotipo silvestre, tg: transgénico, T: trombina.

De forma similar a lo observado en el análisis de la activación plaquetaria, en general, las plaquetas tgC3G fueron más sensibles a la inhibición de la agregación por U0126 o SB203580 que sus controles correspondientes, sobre todo a los 10 minutos de estimulación, si bien en este caso las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura R-32). En cambio, las plaquetas tgC3GΔCat no mostraron diferencias de agregación con respecto a sus controles, o en todo caso, mostraron una tendencia a una mayor resistencia al inhibidor SB203580 a los 10 minutos de estimulación con trombina.

Estos resultados están en concordancia con los resultados de activación de las Figuras R-30 y R-31 y sugieren la participación de C3G en las rutas de estas dos MAPK en plaquetas, probablemente a través de su acción GEF sobre Rap1

5.11.3 C3G no tiene efecto directo sobre la activación de las MAPK ERK1/2 y p38 MAPK.

Los resultados anteriores sugieren que C3G participaría en las rutas de ERK1/2 y p38 MAPK, bien activando a dichas kinasas o como un sustrato de las mismas. Para estudiar si C3G participa en la activación de las MAPK, ERK1/2 y p38 evaluamos, en plaquetas purificadas de los distintos genotipos de ratón, la fosforilación de dichas proteínas, como una medida de su actividad.

Para este estudio las plaquetas se estimularon con trombina previo tratamiento durante 5 minutos con diferentes inhibidores, como clopidogrel, wortmanina, bisindolilmaleimida, 2-MesAMP, SB203580 o MRS2179. La fosforilación de ERK1/2 y de p38 MAPK se determinó mediante Western Blot con anticuerpos fosfo-específicos (Tabla M-6).

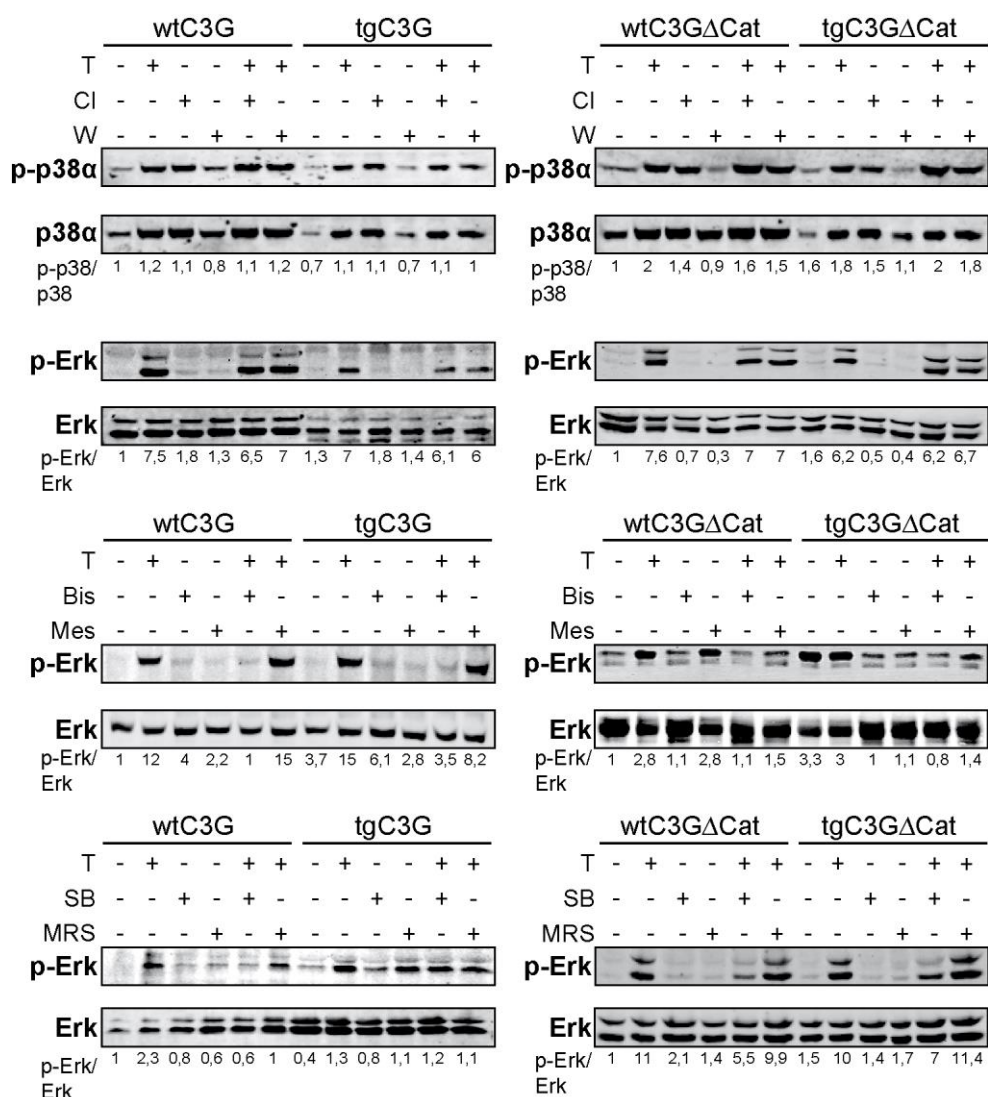


Figura R-33. La activación de ERK y p38α MAPK por trombina es independiente de C3G.

Las plaquetas de animales tgC3G, tgC3GΔCat y sus correspondientes controles fueron pretratadas con clopidogrel (100 μM), wortmanina (100 nM), bisindolilmaleimida (5 μM), 2-MeSAMP (50 μM), SB203580 (20 μM) o MRS2179 (20 μM), durante 5 min y a continuación se estimularon (+) o no (-) con trombina (1U/ml) (T) durante 1 min a temperatura ambiente. Las proteínas fueron detectadas por Western Blot con anticuerpos anti p-Erk, Erk, p-p38α y p-38 (ver Tabla M-6). Los valores se relativizaron con relación a los niveles de las plaquetas sin tratar y se normalizaron frente a Erk total. La relación p-Erk/Erk total y p-38α/p-38α total está indicada debajo de los blots. wt: genotipo silvestre, tg: transgénico, Cl: clopidogrel, W: wortmanina, BIS: bisindolilmaleimida, Mes: 2-MeSAMP, SB: SB203580, MRS: MRS2179.

Como se observa en la Figura R-33, la trombina activa tanto ERK1/2 como p38 MAPK en plaquetas. Sin embargo, no se observan diferencias de activación entre las plaquetas transgénicas y sus correspondientes controles silvestres. Únicamente hemos observado una

mayor fosforilación de ERK1/2 en plaquetas tgC3G pretratadas con el inhibidor de p38 MAPK, con respecto a plaquetas control. Por otra parte, solamente el inhibidor de PKC, bisindolilmaleimida, inhibió claramente la activación de ERK1/2 inducida por trombina. Este hecho no es sorprendente ya que se sabe que PKC activa ERK1/2 en la ruta de síntesis de TXA₂ (Yacoub *et al* 2006). Además, sorprendentemente, algunos inhibidores fueron capaces por si solos de estimular la fosforilación de ERK1/2 o p38 MAPK. Tal es el caso del clopidogrel, que indujo la fosforilación de p38 MAPK o el 2-MesAMP, que indujo una cierta fosforilación de ERK1/2. Es posible que dichos inhibidores actúen sobre rutas que regulan negativamente la actividad de estas MAPK (Wu *et al* 2013).

El hecho de que no se observen diferencias entre los distintos genotipos de plaquetas indicaría que C3G no está implicado en la activación de estas MAPK, por lo que quedaba por evaluar la posibilidad de que sean estas MAPK las que regulen la actividad de C3G.

5.11.4 La activación de C3G depende, en parte, de la activación de las MAPK ERK1/2 y p38 MAPK.

Como se ha comentado, las MAPK participan en las rutas de activación de las plaquetas y en la producción de TXA₂ (Kramer *et al* 1995; Borsch-Haubold *et al* 1998; Garcia *et al* 2005; Shankar *et al* 2006). Por otra parte, se ha descrito que el TXA₂, a través de su receptor TXA₂R, induce la activación de Rap1 (Relou *et al* 2003). Además, hemos visto que C3G estaría participando en la regulación de la ruta de síntesis de TXA₂. Por lo tanto, una posibilidad es que las MAPK regulen la activación de Rap1 a través de la producción de TXA₂, mediante una vía que implique la activación de C3G. Para evaluar si ERK1/2 y/o p38 MAPK participan en la activación de C3G se estudió su fosforilación en la Tyr504 en plaquetas de los distintos genotipos mediante ensayos de inmunofluorescencia. Para ello, se trataron las plaquetas con los inhibidores U0126 o SB203580, previamente a la estimulación por trombina 0,5 U/ml durante 1 minuto en agitación. Las plaquetas fijadas fueron incubadas con un anticuerpo que reconoce específicamente dicha Tyr (Tabla M-6). Como se observa en la Figura R-34A, la trombina indujo nuevamente una clara fosforilación de C3G. De nuevo, los niveles de pTyr504-C3G fueron mayores en ambas plaquetas transgénicas con respecto a sus controles (Figura 34B), como cabe esperar dada la sobreexpresión. Sorprendentemente, la fosforilación de C3G se inhibió completamente por pretratamiento con los inhibidores de ERK1/2 y p38 MAPK, sobre todo en las plaquetas tgC3G (Figura R-34 A y B). Este resultado indica la existencia de un mecanismo de regulación positiva de C3G a través de estas MAPK. Dicho mecanismo implicaría, o bien la activación de una tirosina kinasa, que sería la responsable de la fosforilación de C3G en el

residuo de Tyr504, o bien la inactivación de una tirosina fosfatasa, responsable de la desfosforilación en dicho residuo.

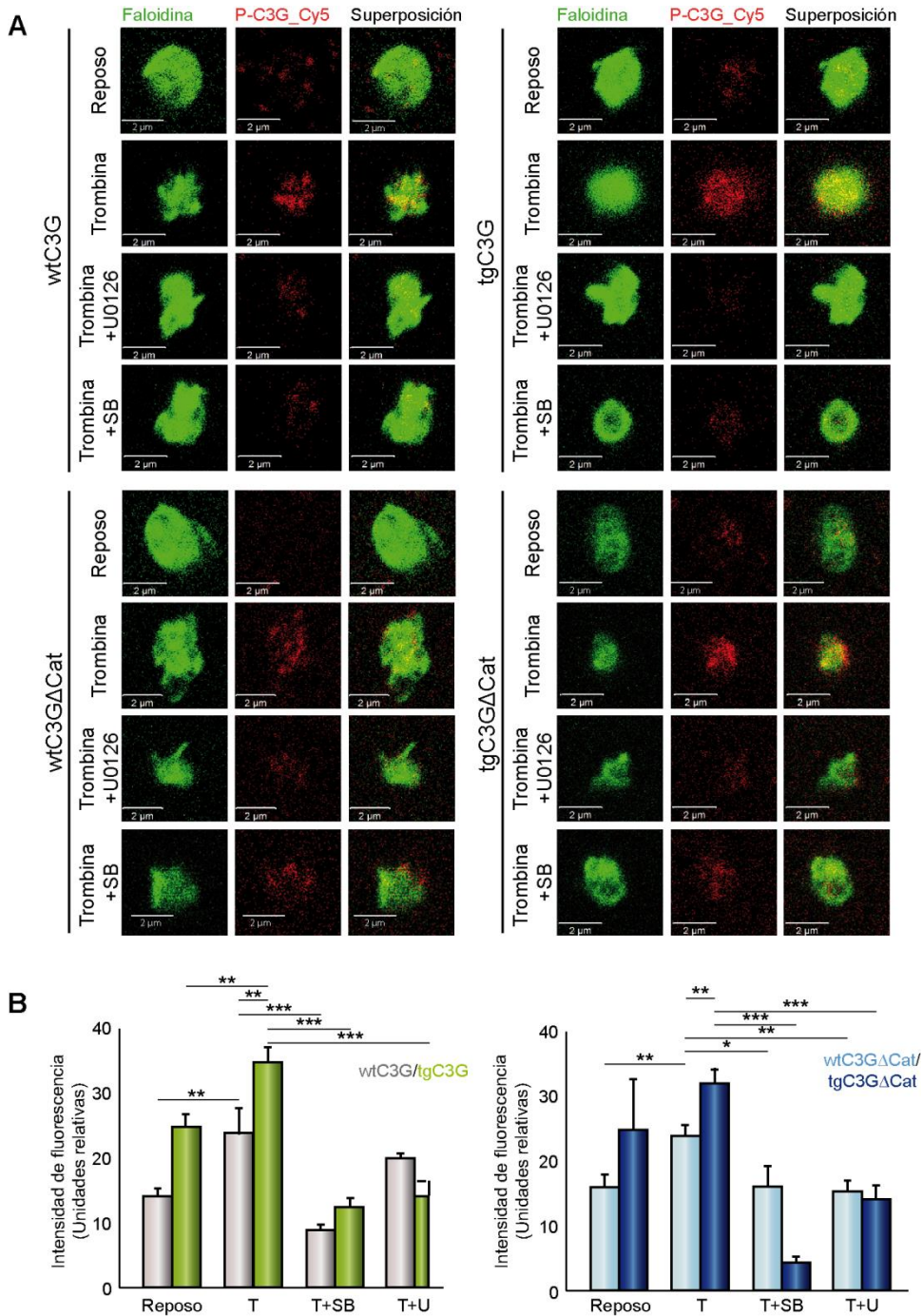


Figura R-34. C3G es fosforilado en plaquetas estimuladas por trombina mediante un mecanismo que implica a las MAPK ERK1/2 y p38 MAPK. (A). Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal muestran plaquetas de ratones tgC3G, tgC3GΔCat y sus correspondientes controles, doblemente marcadas con Faloidina (verde) y anti-pTyr504-C3G_Cy5 (rojo). Las imágenes muestran una plaqueta representativa de cada genotipo con los diferentes tratamientos: reposo, trombina (0,5 U/ml), trombina + U0126 (20 μM), trombina + SB203580 (20 μM). Las imágenes fueron tomadas con los mismos tiempos de exposición. Barra=2 μm. B. Los histogramas muestran la media ± SEM (n>4) de la intensidad de fluorescencia de p-C3G (unidades relativas), cuantificada mediante el programa ImageJ y normalizada frente a la fluorescencia de la actina (Faloidina). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. T: trombina, SB: SB203580, U: U0126.

5.12 LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE C3G POR ERK ES INDEPENDIENTE DE Src.

Los resultados anteriores indican la existencia de un mecanismo que regula positivamente la fosforilación de C3G a través de ERK1/2. Dicho mecanismo tiene que implicar una tirosina quinasa. Se sabe que la proteína C3G después de su translocación a la membrana, mediada por Crk, es fosforilada en el residuo Y504 por tirosina kinasas asociadas a membrana como Src (Radha *et al* 2011). Por otro lado, se sabe que Src está implicada en la ruta de activación de ERK1/2 mediada por trombina en plaquetas (Shankar *et al* 2006; Garcia *et al* 2007). Para determinar si Src es la quinasa responsable de la fosforilación de C3G mediada por ERK1/2 hemos estudiado, mediante inmunofluorescencia, la fosforilación de C3G y de Src en plaquetas de ratones tgC3GΔCat pretratadas con U0126 20 μM o PP2 (inhibidor de Src) 10 μM, y posteriormente estimuladas con trombina 0,5 U/ml durante 1 minuto. La Figura R-35B muestra un incremento significativo de fosforilación de C3G inducido por trombina, especialmente en plaquetas tgC3GΔCat, efecto que ya hemos observado previamente. En presencia de los inhibidores U0126 o PP2, C3G sufre una significativa desfosforilación, acorde con los resultados anteriores en el caso del U0126, y con el hecho de que C3G es principalmente fosforilada por Src. En cambio, no observamos ningún efecto del inhibidor U0126 sobre la fosforilación de Src (Figura R-35B). Estos resultados indican que la fosforilación de C3G por Src no está mediada por ERK1/2, lo que sugiere la posibilidad de que la regulación de C3G por ERK1/2 sea a través de una tirosina fosfatasa.

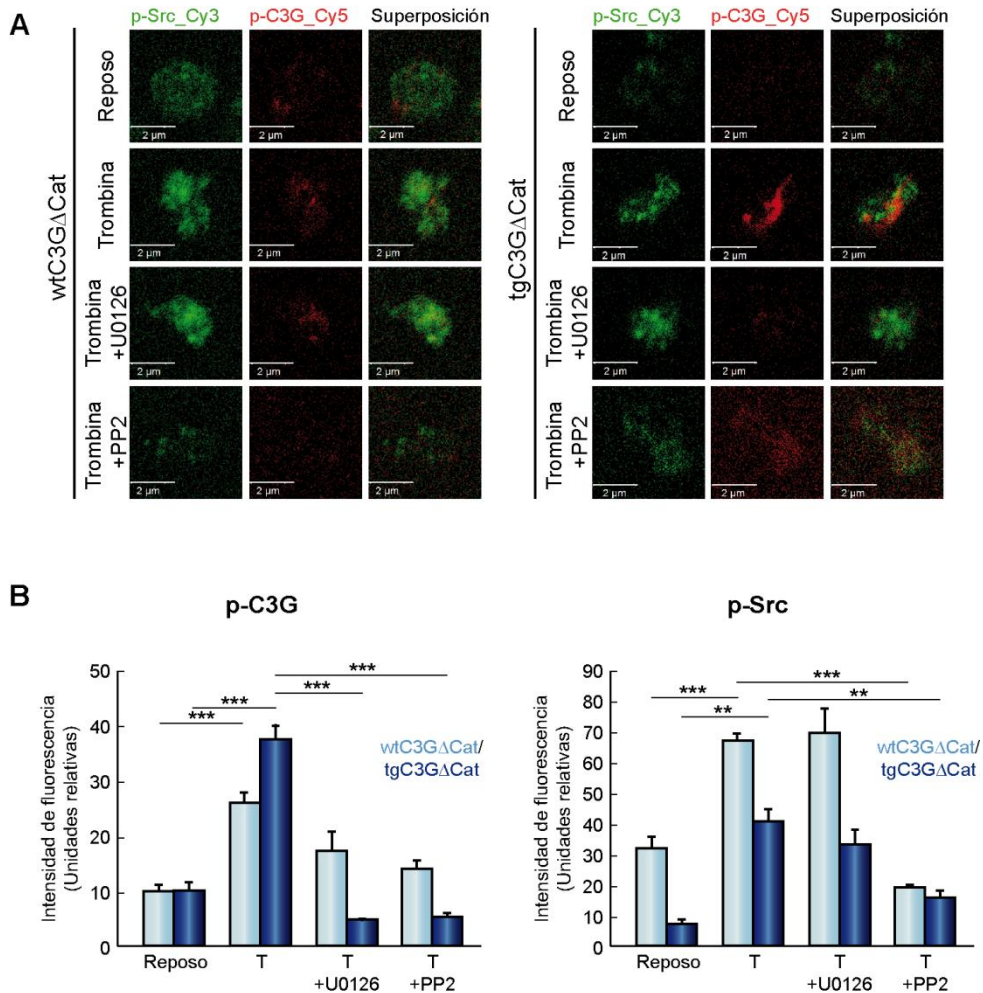


Figura R-35. La fosforilación de C3G mediada por Src no está regulada por ERK1/2. (A). Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal muestran plaquetas de ratones tgC3GΔCat y sus correspondientes controles, doblemente marcadas con anti-pY418-Src_Cy3 (verde) y anti-pTyr504-C3G_Cy5 (rojo). Las imágenes muestran una plaqueta representativa de cada genotipo con los diferentes tratamientos: reposo, trombina (0,5 U/ml), trombina + U0126 (20 μM), trombina + PP2 (10 μM). Las imágenes fueron tomadas con los mismos tiempos de exposición. Barra=2 μm. (B). Los histogramas representan la media ± SEM (n>5) de la intensidad de fluorescencia (unidades relativas) de las proteínas p-C3G y p-Src. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia se ha realizado con el programa ImageJ. **p<0,01, ***p<0,001. T: trombina.

5.13 ERK REGULA LA ACTIVIDAD DE C3G POR INHIBICIÓN DE LA FOSFATASA Shp2

Las funciones plaquetarias están finamente reguladas por mecanismos de inhibición que estabilizan el proceso de coagulación (Smolenski 2012). Entre las proteínas que regulan la

activación plaquetaria se encuentran fosfatasa como la tirosina fosfatasa Shp2 (PTPN11) (Mazharian *et al* 2013). Esta tirosina fosfatasa es fosforilada e inhibida por la MAPK ERK1/2 en otros tipos celulares (Peraldi *et al* 1994). Nuestros resultados han demostrado que el tratamiento con inhibidores de MAPK, como el U0126 o el SB203580, provoca la desfosforilación de C3G en el residuo de Tyr504, lo que sugiere un mecanismo de regulación positiva de C3G a través de estas MAPK, posiblemente mediado por la inhibición de una tirosina fosfatasa ya que hemos visto que Src no está implicada en este proceso. Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue determinar si la tirosina fosfatasa Shp2 estaba implicada en la regulación de la activación de C3G.

5.13.1 La desfosforilación de C3G en presencia del inhibidor de ERK1/2 es dependiente de Shp2.

Para estudiar la posible implicación de Shp2 en la regulación de C3G por ERK1/2 se trataron las plaquetas con los inhibidores U0126, SHP099 (un inhibidor de Shp2) o ambos, previamente a la estimulación por trombina 0,5 U/ml durante 1 minuto en agitación. Las plaquetas fijadas fueron incubadas con el anticuerpo anti-pTyr504-C3G (Tabla M-6). Como se observa en la Figura R-36A, la trombina indujo una clara fosforilación de C3G, como ya habíamos observado en experimentos anteriores. De nuevo, los niveles de pTyr504-C3G fueron mayores en las plaquetas transgénicas con respecto a sus controles (Figura R-36B). Sorprendentemente, parte de la fosforilación de C3G que se inhibe por pretratamiento con el inhibidor de ERK1/2, se recupera en presencia del inhibidor SHP099, sobre todo en las plaquetas tgC3G (Figura R-36-A y B). Este resultado confirma la existencia de un mecanismo de regulación positiva de C3G mediado por ERK1/2 a través de la inhibición de Shp2, que estaría indirectamente implicado en la fosforilación de C3G por trombina en el residuo de Tyr504.

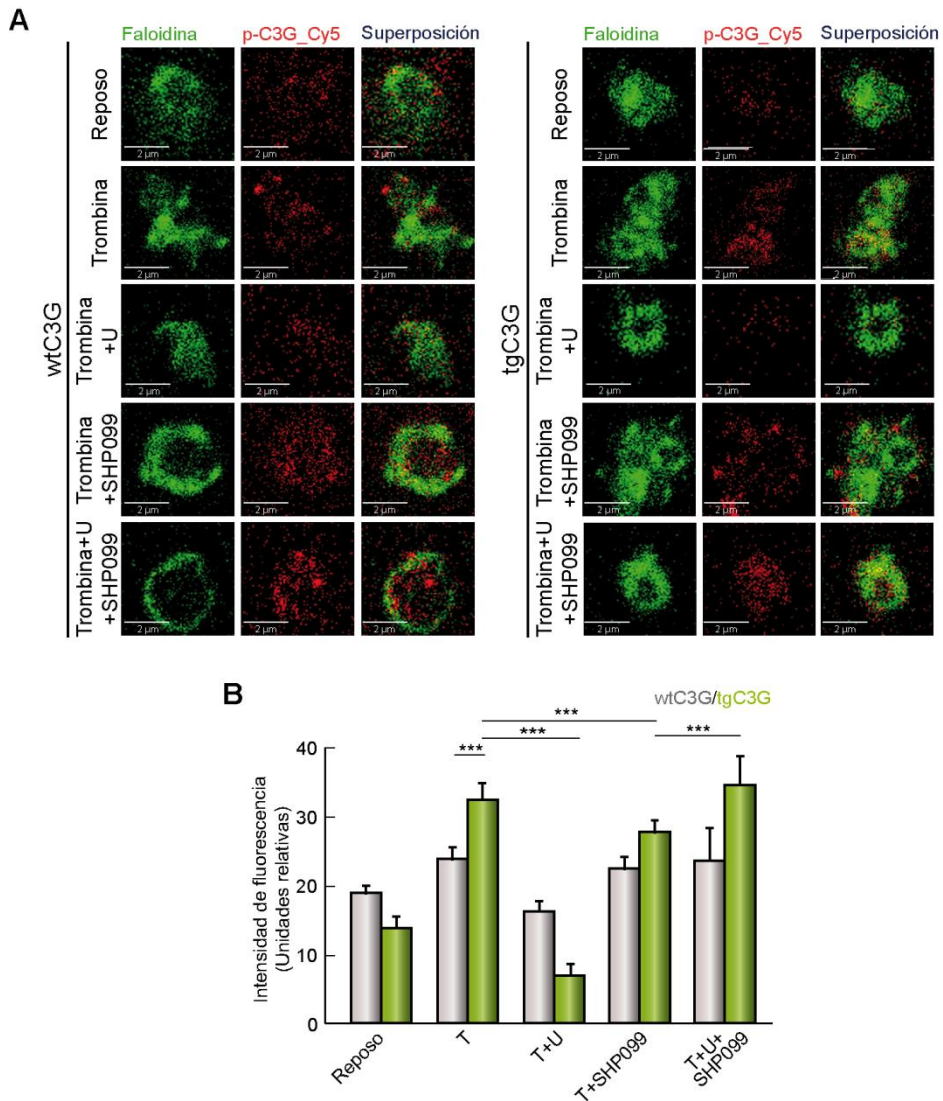


Figura 36. La fosfatasa Shp2 regula la fosforilación de C3G en plaquetas estimuladas por trombina. (A). Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal muestran plaquetas de ratones tgC3G y sus correspondientes controles, doblemente marcadas con Faloidina (verde) y anti-pTyr504-C3G_Cy5 (rojo). Las imágenes muestran una plaqueta representativa de cada genotipo con los diferentes tratamientos: reposo, trombina (0,5 U/ml), trombina + U0126 (20 μ M), trombina + SHP099 (20 μ M) y trombina + U0126 + SHP099. Las imágenes fueron tomadas con los mismos tiempos de exposición. Barra=2 μ m. (B). El histograma representa la media \pm SEM (n>4) de la intensidad de fluorescencia (unidades relativas) de p-C3G, cuantificada mediante el programa ImageJ, relativizada frente a la fluorescencia de la actina (Faloidina). ***p<0,001. T: trombina, U: U0126.

5.13.2 C3G y Shp2 co-localizan en la plaqueta permitiendo su interacción.

Para comprobar si Shp2 es la fosfatasa responsable de la desfosforilación de C3G en presencia del inhibidor de ERK1/2, realizamos un estudio de co-localización mediante inmunofluorescencia. Para ello se trataron las plaquetas con los inhibidores U0126 o SHP099, previamente a la estimulación por trombina 0,5 U/ml durante 1 minuto en agitación. Las plaquetas fijadas fueron incubadas con un anticuerpo que reconoce específicamente la Tyr504 de C3G, junto con un anticuerpo que reconoce Shp2 (Tabla M-6). La Figura R-37 muestra la existencia de co-localización entre p-C3G y Shp2, que fue significativamente mayor en plaquetas de ratones transgénicos para C3G tratadas con trombina + U0126, es decir en la condición de mayor desfosforilación de C3G (ver Figuras R-34, R-35 y R-36). Parte de esta co-localización se pierde cuando se tratan las plaquetas con el inhibidor de Shp2, SHP099, pero se recupera cuando las plaquetas se tratan con ambos inhibidores U0126 y SHP099 (Figura R-37), indicando que ERK1/2 regula negativamente a la fosfatasa Shp2. Estos resultados, por tanto, apoyan la idea de que Shp2 es la fosfatasa regulada por ERK1/2 que desfosforila a C3G.

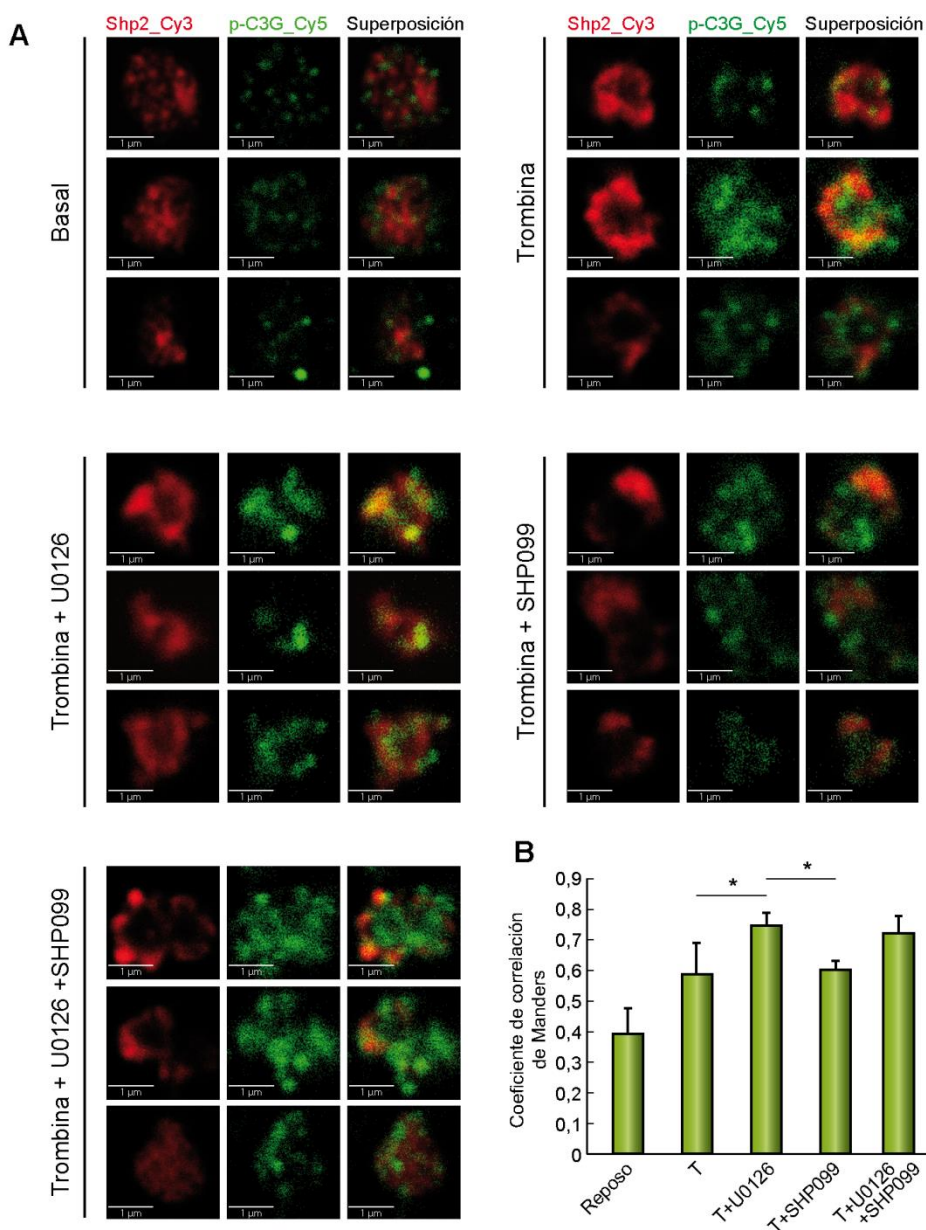


Figura R-37. Las plaquetas tgC3G muestran una mayor co-localización entre p-C3G y Shp2 en ausencia de p-ERK1/2. (A) Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal muestran plaquetas de ratones tgC3G doblemente marcadas con anti-pTyr504-C3G_Cy5 (verde) y anti-Shp2_Cy3 (anti-SH-PTP2 B1) (rojo). Las imágenes muestran tres plaquetas representativas de cada genotipo con los diferentes tratamientos: reposo, trombina (0,5 U/ml), trombina + U0126 (20 μM) y trombina + SHP099 (20 μM). Las imágenes fueron tomadas con los mismos tiempos de exposición. Barra=2 μm. (B). El histograma representa los coeficientes de correlación de Manders (media ± SEM, n=5) de la co-localización entre p-C3G y Shp2, calculados mediante el programa ImageJ. * $p < 0,05$. T: trombina.

5.13.3 Shp2 regula la actividad de C3G.

Con la finalidad de confirmar el papel de Shp2 en la regulación negativa de C3G, analizamos la implicación de Shp2 en la activación de Rap1 mediada por C3G. Para ello se analizó la activación de Rap1 en plaquetas tgC3G pretratadas con los inhibidores de ERK1/2 y Shp2 (U0126 y SHP099) previamente a la estimulación con 0,2 U/ml de trombina. La Figura R-38 muestra una ligera disminución de los niveles de Rap1-GTP en plaquetas pretratadas con U0126, con respecto a plaquetas estimuladas solo con trombina, lo que está de acuerdo con una regulación positiva de C3G por ERK1/2. Por el contrario, el pretratamiento con SHP099 produjo un incremento de Rap1 activado, con respecto a las plaquetas estimuladas con trombina, lo que nuevamente sugiere una regulación negativa de la fosfatasa Shp2 sobre C3G-Rap1. Más aun, el inhibidor SHP99 revirtió la inhibición de Rap1-GTP provocada por U0126. Este resultado está de acuerdo con los resultados de fosforilación de C3G y co-localización con Shp2 de las Figuras R-36 y R-37, sugiriendo todos ellos que la MAPK ERK1/2 está involucrada en un mecanismo de regulación positiva de C3G a través de la inhibición de la tirosina fosfatasa Shp2.

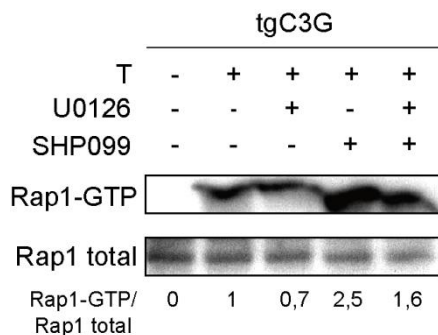


Figura R-38. La inhibición de Shp2 incrementa los niveles de Rap1-GTP. Las plaquetas de animales tgC3G fueron estimuladas o no con trombina (1 U/ml) durante 1 minuto en presencia o no de 20 μ M de los inhibidores U0126 y SHP099 durante 5 min a 37°C en agitación. Posteriormente las plaquetas se lisaron y se aisló la forma de Rap1 unida a GTP mediante su interacción con GST-RalGDS-RBD, y posterior detección por Western Blot con anticuerpos anti-Rap1. tg: transgénico, T: trombina. Los valores están relativizados frente a la activación con trombina y normalizados frente a Rap1 total.

DISCUSIÓN

6 DISCUSIÓN

En este trabajo se ha demostrado por primera vez la implicación de C3G en la función de las plaquetas, actuando como un importante GEF de Rap1 a través de diferentes vías de señalización dependientes de trombina, colágeno y de ADP, así como en la regulación de la síntesis del TXA₂.

6.1 C3G regula la función homeostática de las plaquetas.

Para la realización de este estudio se han utilizado dos modelos transgénicos de ratón, uno que expresa el gen C3G humano completo y otro que expresa el mutante C3GΔCat, que carece de parte del dominio GEF. La expresión de ambos transgenes está regulada por el promotor del gen PF4, específico tanto de plaquetas como de megacariocitos. El funcionamiento del plásmido utilizado para generar estos modelos transgénicos ha sido ampliamente validado, de forma que su expresión queda restringida a estos dos tipos celulares (Ravid *et al* 1991a; Ravid *et al* 1991b; Zhang *et al* 2004; Papadantonakis *et al* 2008).

Previamente al estudio de las posibles funciones de C3G en plaquetas, se comprobó la expresión de los transgenes C3G y C3GΔCat en las líneas de ratones generadas, mediante RT-PCR semicuatitativa a partir de ARN total de plaquetas purificadas. El hecho de que las plaquetas carezcan de núcleo garantiza que nuestros preparados de ARN no están contaminados de ADN genómico. Además, en los análisis de PCR, cada par de oligonucleótidos amplifica varios exones, lo que asegura el origen de ADNc de la muestra y descarta contaminación de ADN genómico de otros tipos celulares. Los oligonucleótidos usados, tanto en el genotipado como en la caracterización de la expresión de los animales transgénicos se corresponden con la secuencia del gen C3G humano (Tabla M-2). Por tanto, la mayoría del C3G detectado es el transgén humano. Sin embargo, considerando la elevada homología entre la secuencia del gen humano y de ratón (87%), los oligos también detectan la expresión del gen C3G endógeno en los animales de tipo silvestre (Figura R-1). La sobreexpresión de la proteína transgénica C3G es evidente, tanto en megacariocitos como en plaquetas, y sus niveles son suficientes para modificar la actividad de Rap1 (Figura R-13) y alterar la función plaquetaria (Figuras R-8, R-9 y R-10).

Los resultados derivados de los experimentos de coagulación demuestran que C3G juega un importante papel en la función hemostática de las plaquetas. Así, mientras los animales controles dejaban de sangrar en los 2 primeros minutos tras el corte de la cola, los animales transgénicos para C3G lo hacían durante el primer minuto. Por el contrario, los animales transgénicos para C3GΔCat continuaban sangrando durante un tiempo superior a 8

minutos, tiempo límite marcado para el experimento para evitar la muerte por exanguinación (Figura R-5). Además, también hemos comprobado que en los ratones transgénicos para C3G hay un incremento en la formación de trombos en circulación (Figura R-11 y R-12), lo que está de acuerdo con la mayor tasa de coagulación observada y apoya un papel importante de C3G en la función plaquetaria. Estos resultados están en concordancia con otros estudios que demuestran un papel de Rap1b en la regulación del estado de afinidad de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ en plaquetas y megacariocitos de ratón (Bertoni *et al* 2002; Chrzanowska-Wodnicka *et al* 2005). El hecho de no encontrar diferencias en el número de plaquetas entre los diferentes genotipos, indica que C3G no afecta a la formación de las plaquetas y que las alteraciones hemostáticas observadas son debidas a alteraciones de la función plaquetaria.

De hecho, nuestros resultados indican que C3G es capaz de regular la activación y/o agregación plaquetaria inducida por varios agonistas, tales como trombina, ADP, PMA y colágeno, los cuales se sabe que activan a Rap1 (Chrzanowska-Wodnicka *et al* 2005). El hecho de que las plaquetas tgC3G Δ Cat muestren una menor activación que sus controles de tipo silvestre sugiere que la mayor actividad plaquetaria inducida por C3G está mediada por su activación sobre Rap1. El incremento en la activación de la integrina plaquetaria $\alpha\text{IIb}\beta 3$ observado en las plaquetas tgC3G estimuladas con trombina, ADP o colágeno no se debió a un incremento en la expresión génica de la integrina inducido por C3G, ya que no se observaron diferencias significativas en el contenido de integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ entre los distintos genotipos (Figura R-3). Por otra parte, los ensayos de agregación mediada por fibrinógeno indican que C3G juega un papel en la activación *inside-out* de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, mientras que su participación en las rutas de trombina, PMA, ADP o colágeno indicaría su contribución a la señalización de tipo *outside-in*. Además, probablemente C3G contribuye a la activación plaquetaria mediada por colágeno a través de la glicoproteína GPVI, el principal receptor de colágeno, el cual se sabe que activa a Rap1 en plaquetas (Kauffenstein *et al* 2001; Larson *et al* 2003; Nieswandt *et al* 2009).

6.2 La expresión transgénica de C3G en plaquetas induce un incremento en el número de neutrófilos.

Los ratones transgénicos para C3G, pero no los transgénicos para C3G Δ Cat, mostraron un incremento significativo en el número de neutrófilos (Figuras R-6 y R-7). Como se esperaba, los neutrófilos purificados, no expresaban el gen C3G (datos no mostrados). Este hecho plantea la posibilidad de que exista un efecto indirecto de la sobreexpresión de C3G en plaquetas, que podría conllevar una liberación de factores derivados de plaquetas capaces de estimular el desarrollo de los neutrófilos. Se sabe que las plaquetas secretan quimiocinas que atraen a los neutrófilos y activan la producción de citocinas proinflamatorias por parte de los

mismos (Zarbock *et al* 2007). Por ejemplo, CXCL4 (PF4) puede activar a los neutrófilos en presencia de un coestímulo apropiado como es el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Por lo tanto, es razonable plantear la hipótesis de que C3G podría estimular la producción y liberación de factores plaquetarios que estimulen la producción de neutrófilos. En este sentido, una reciente publicación del grupo ha demostrado la implicación de C3G en la secreción de factores plaquetarios reguladores de la angiogénesis contenidos en sus gránulos α (Martín-Granado *et al.*, 2017). Sin embargo, no hemos podido detectar la secreción diferencial de alguna de las quimiocinas implicadas en el desarrollo y la activación de los neutrófilos. Por otra parte, en la mayoría de experimentos, las plaquetas tgC3G muestran una mayor activación basal que las de genotipo silvestre. Este hecho, por sí sólo podría explicar el mayor número de neutrófilos en la sangre circulante de estos ratones transgénicos ya que está descrito que la P-selectina es un importante ligando para neutrófilos (Zarbock *et al* 2007). De hecho, en algunos trabajos se ha utilizado la interacción neutrófilo-plaqueta a través de P-selectina como un método para el estudio de la activación plaquetaria, ya que parece ser más sensible que el estudio de la expresión de P-selectina (Michelson *et al* 2001).

Resultados de nuestro grupo y otros, sostienen la idea de que C3G está involucrado en la leucemia mieloide crónica (LMC) (Grumbach *et al* 2001; Gutierrez-Berzal *et al* 2006; Maia *et al* 2009). La fase crónica de la enfermedad se caracteriza por la presencia de un elevado porcentaje de neutrófilos maduros en sangre periférica, los cuales presentan elevados niveles de CrkL fosforilado, un adaptador constitutivo de C3G (Oda *et al* 1994). Además, las funciones plaquetarias como la agregación y la retracción del coágulo, son a menudo anormales en pacientes de LMC (Oda *et al* 1994; M'Rabet *et al* 1998). De forma similar a lo observado en neutrófilos, Crkl es también fosforilado de forma anormal en plaquetas de pacientes de LMC (Oda *et al.*, 1996). Un hecho interesante, que además concuerda con el posible papel de C3G en neutrófilos, es que Rap1a es activado por una variedad de estímulos que participan en las funciones de neutrófilos (M'Rabet *et al* 1998). Así, Rap1a interactúa con la oxidasa de NADPH de neutrófilos (Quinn *et al* 1989) y estimula la producción de anión O_2^- durante la explosión oxidativa (Li *et al* 2007). También se ha visto que CalDAG-GEFI, otro GEF de Rap1, juega un papel importante en la función de los neutrófilos (Bergmeier *et al* 2007; Pasvolsky *et al* 2007). Basándonos en este hecho, nuestros modelos transgénicos para C3G podrían ser interesantes herramientas para estudiar, en un fondo genético Bcr-Abl, si C3G desempeña un papel en el proceso inicial del desarrollo de la LMC, mediante la inducción de una producción anormal de neutrófilos y una alteración de la función plaquetaria.

6.3 C3G participa en la activación de Rap1 inducida por trombina a través de PKC.

Hasta el momento, CalDAG-GEFI era el único GEF de Rap1b con un papel demostrado en la función plaquetaria (Crittenden *et al* 2004; Cifuni *et al* 2008). Los ratones *knock out* para CalDAG-GEFI presentan una agregación plaquetaria deficiente en respuesta a bajas concentraciones de PMA y una ausencia total de respuesta a bajas concentraciones de trombina. Sin embargo, las plaquetas *knock out* para CalDAG-GEFI se activan de forma normal a concentraciones más elevadas de esos agonistas (10X), y mantienen una respuesta parcial al colágeno indicando la existencia de rutas de señalización independientes de CalDAG-GEFI (Figura I-12) (Crittenden *et al* 2004; Cifuni *et al* 2008; Nieswandt *et al* 2009). En este trabajo hemos demostrado que C3G se expresa endógenamente en plaquetas (Figura R-1, R-2 y R-3). Por lo tanto, dado que C3G es el principal GEF de Rap1 en diferentes tipos celulares (Radha *et al* 2011) y que Rap1b tiene una función esencial en plaquetas (Torti *et al* 1994; Stork *et al* 2005), es posible que, además de CalDAG-GEFI, C3G desempeñe un papel fisiológico actuando como GEF de Rap1b en plaquetas bajo ciertos estímulos.

Nuestros resultados indican que C3G participa, al menos, en la activación y agregación plaquetaria inducidas por trombina, PMA, ADP y colágeno. En las plaquetas, la trombina induce una temprana activación de Rap1b, a través de vías mediadas por calcio, de forma dependiente de CalDAG-GEFI e independiente de la activación de PKC (Franke *et al* 2000). Este proceso es seguido por una segunda fase de activación de Rap1b mediada por PKC (Franke *et al* 1997; Franke *et al* 2000; Crittenden *et al* 2004). Nuestros resultados muestran un incremento en la respuesta plaquetaria a trombina en animales transgénicos C3G, en comparación con sus controles de genotipo silvestre, y una respuesta disminuida en las plaquetas de animales transgénicos C3G Δ Cat, sugiriendo que C3G participa en la activación de Rap1 mediada por trombina. Este hecho queda confirmado mediante los ensayos de activación de Rap1, donde se observa un incremento de los niveles de Rap1-GTP en plaquetas de ratones transgénicos estimuladas con trombina o PMA, en comparación con sus controles correspondientes (Figuras R-13A y R-14). Por otra parte, se sabe que Rap1b, en condiciones de agregación, sufre una sobreactivación seguida de una drástica inhibición como consecuencia de su translocación de la membrana plasmática a la fracción del citoesqueleto (Franke *et al* 2000). De acuerdo con este hecho, las plaquetas de ratones tgC3G muestran una rápida inhibición de Rap1 en condiciones de agregación, mientras que la desactivación de Rap1 en estas condiciones está retardada en plaquetas tgC3G Δ Cat con respecto a sus controles (Figura R-13B).

Basándonos en los resultados que muestran un incremento de la activación de plaquetas tgC3G mediada por PMA, junto con el hecho de que la agregación plaquetaria inducida por PMA no se ve afectada en plaquetas *knock out* para CalDAG-GEFI (Crittenden *et al* 2004),

proponemos un modelo en el que C3G participaría de forma específica en la segunda fase de activación de Rap1, dependiente de PKC, inducida por trombina (Franke *et al* 2000; Cifuni *et al* 2008) (Figura D-1). Esta hipótesis está reforzada por los resultados mostrados en las Figuras R-14 y R-15, que muestran que, tanto la activación de Rap1, como la activación plaquetaria mediada por PKC dependen principalmente de C3G. La participación de C3G en la ruta PMA-PKC-Rap1 está avalada por los experimentos de inmunofluorescencia de la Figura R-16, que muestran una total dependencia de PKC en la fosforilación de la Tyr504 de C3G, la cual está implicada en su activación (Ichiba *et al* 1999). Sin embargo, dado que PKC es una serina/treonina kinasa, no puede ser la responsable directa de la fosforilación de C3G en este residuo de Tyr504. Src es una de las principales tirosina kinasas implicadas en la fosforilación de C3G en diferentes tipos celulares (Ichiba *et al* 1999; Ling *et al* 2003; Shivakrupa *et al* 2003; Radha *et al* 2004; Radha *et al* 2011). De hecho, los resultados de la Figura R-35 muestran que la fosforilación de la Tyr504 de C3G es dependiente de Src. Dado que la activación de Src está regulada por tirosina fosfatasa dependiente de PKC (Brandt *et al* 2003), Src podría ser la tirosina kinasa responsable de la fosforilación de C3G dependiente de PKC.

El incremento en los niveles de Rap1-GTP inducidos por trombina o PMA en plaquetas tgC3G podrían ser un reflejo de los mayores niveles basales de Rap1-GTP observados en estas plaquetas (Figura R-13A, R-14 y R-24). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los niveles de Rap1-GTP en plaquetas tgC3G estimuladas con estos agonistas son mayores que la suma de los niveles basales en estas plaquetas y los inducidos por PMA o trombina en plaquetas silvestres, lo que sugiere una amplificación de la respuesta a la trombina y el PMA en las plaquetas tgC3G y, por tanto, la participación de C3G en la ruta Trombina-PKC. No podemos excluir la posibilidad de que otros GEF de Rap1, con expresión detectable en plaquetas de ratón (Rowley *et al* 2011; Zeiler *et al* 2014), pudieran contribuir a la activación de Rap1 dependiente de PKC, ya que las plaquetas tgC3G Δ Cat muestran cierto grado de agregación cuando se estimulan con PMA (Figura R-10).

Los resultados obtenidos con el transgén C3G de longitud completa están reforzados por el uso de dos líneas quiméricas diferentes 2C1 y 6A6. Además, los resultados obtenidos con este modelo transgénico están a su vez avalados por los resultados mostrados con el transgén C3G Δ Cat (línea 8A3), el cual se comporta como un dominante negativo (DN) bloqueando la activación de Rap1 y, consecuentemente la función plaquetaria. La función DN está claramente demostrada por la disminución de los niveles de Rap1-GTP observados en plaquetas C3G Δ Cat estimuladas con trombina (Figura R-13A) y PMA (Figuras R-14). Este mutante C3G Δ Cat (el cual carece de los aminoácidos esenciales para la función GEF, pero conserva el dominio REM) podría actuar secuestrando a su efector Rap1 formando un complejo inactivo, evitando la activación de Rap1 por otros GEF. Esta hipótesis está de acuerdo con los resultados de las Figuras R-8, R-9 y R-10, que muestran una menor respuesta a los agonistas por parte de las

plaquetas C3GΔCat, en comparación con sus controles silvestres. La acción DN de este mutante ha sido demostrada en otros sistemas (Guerrero *et al* 2004; Martin-Encabo *et al* 2007). El hecho de que los efectos del mutante C3GΔCat sean opuestos a los del transgén C3G completo demuestra claramente que C3G tiene un efecto directo sobre Rap1 y que los resultados obtenidos no son debidos al azar o a posibles artefactos experimentales.

En resumen, basándonos en los resultados de este apartado, junto con resultados previos que demuestran la existencia de dos rutas independientes de activación de Rap1 por trombina, una a través de CalDAGEFI y una segunda fase de activación mediada por PKC (Franke *et al* 2000; Cifuni *et al* 2008), proponemos un modelo donde C3G sería el GEF responsable de la activación de Rap1 mediada por trombina a través de la vía dependiente de PKC (Figura D-1). De acuerdo con este modelo, sería necesaria la intervención de una tirosina quinasa (probablemente Src) modulada por PKC responsable de la fosforilación de C3G.

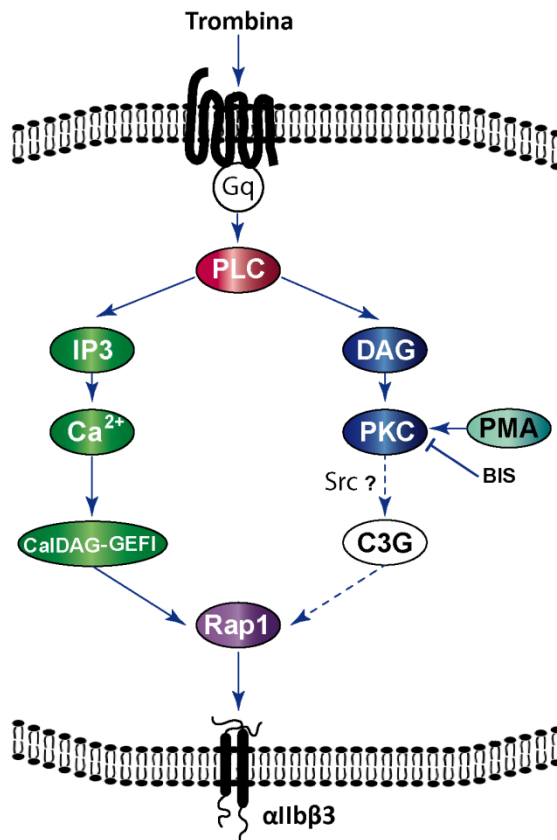


Figura D1. Modelo propuesto de la participación de C3G en la activación de Rap1 por trombina en plaquetas de ratón. C3G participaría en la activación de Rap1 mediada por PKC. PLC-β2: fosfolipasa C β2; BIS: Bisindolilmaleimida; DAG: diacilglicerol; IP3: Inositol trifosfato.

6.4 C3G participa en la señalización de Rap1 mediada por ADP-P2Y12-PI3K

El ADP es un agonista plaquetario capaz de activar a Rap1 a través de sus dos receptores, P2Y1 y P2Y12, los cuales estimulan rutas diferentes (Gachet *et al* 1991; Lova *et al* 2002; Jung *et al* 2006). Nuestros resultados (Figuras R-8 y R-10) muestran que las plaquetas tgC3G presentan una mayor respuesta al ADP, tanto en ensayos de activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ como de agregación (en nuestro sistema, el ADP resultó un débil inductor de desgranulación, lo que está de acuerdo con otros autores (Nieswandt *et al* 2007)). Esto indica que C3G podría mediar, al menos en parte, la activación de Rap1 inducida por ADP. Por lo tanto consideramos relevante seguir profundizando en el estudio de la contribución de C3G en las rutas de señalización mediadas por ADP mediante el uso de inhibidores específicos de los dos tipos de receptores, así como inhibidores de otros componentes de estas rutas. Para los estudios de agregación en presencia de inhibidores hemos estandarizado previamente una novedosa técnica de agregación plaquetaria basada en citometría de flujo (De Cuyper *et al* 2013).

El ADP es un agonista débil de agregación plaquetaria. Debido a esto, no hemos detectado una activación significativa de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ inducida por ADP en ensayos realizados con el anticuerpo JON/A (datos no mostrados). Sin embargo, el ADP activa claramente la unión de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ al fibrinógeno, lo cual, concuerda con el efecto sinérgico entre el ADP y el fibrinógeno (Gachet *et al* 1991).

Se ha descrito que el ADP activa a Rap1, a través de receptores P2Y12 en una ruta mediada por PI3K. En cambio, su unión a receptores P2Y1, conduce a la activación de Rap1, a través de una ruta mediada por CalDAG-GEFI (Woulfe *et al* 2002). Nuestros resultados indican que las plaquetas tgC3G son más sensibles a los inhibidores de P2Y12, como clopidogrel y 2MesAMP, tanto en respuesta a la desgranulación (expresión de P-selectina), como a la activación de la integrina/agregación, que las plaquetas de los animales de genotipo silvestre, mientras que las plaquetas tgC3G Δ Cat muestran la tendencia contraria. Este efecto se produce tanto en presencia de trombina como de ADP, indicando que C3G estaría implicado en la ruta de activación trombina/ADP-P2Y12 que conduce a la activación plaquetaria y la agregación (Figuras R-18, R-19 y R-22), y que la trombina actuaría a través de la inducción de la secreción de gránulos plaquetarios (Kunapuli *et al* 2003). En efecto, la mayor expresión de P-selectina detectada en la superficie de plaquetas tgC3G estimuladas con trombina, induce a pensar en una mayor liberación de gránulos por parte de las plaquetas de animales tgC3G con respecto a las plaquetas de sus hermanos de genotipo silvestre. El hecho de que las plaquetas tgC3G Δ Cat se comporten de forma opuesta a las plaquetas tgC3G en respuesta a ADP indicaría que C3G, al igual que en la ruta trombina-PKC, estaría participando como GEF de Rap1 en esta ruta. Este

papel de C3G en la vía ADP-P2Y12-PI3K-Rap1 queda demostrado por la inhibición de la activación de Rap1 en plaquetas tgC3G pretratadas con los inhibidores de P2Y12 y PI3K (2-MesAMP y wortmanina respectivamente), inhibición que no se observa en las plaquetas de genotipo silvestre (Figura R-24). En concordancia, las plaquetas tgC3GΔCat mostraron niveles muy bajos de Rap1-GTP en respuesta a trombina, los cuales no se vieron afectados por wortmanina o 2-MesAMP. Esto está de acuerdo con la menor inhibición de la activación y la agregación observada en estas plaquetas en presencia de clopidogrel, inhibidor del receptor P2Y12.

En conjunto, todos estos resultados sugieren un papel de C3G en la vía ADP-P2Y12-PI3K que conduce a la activación de Rap1 (Figura D-2).

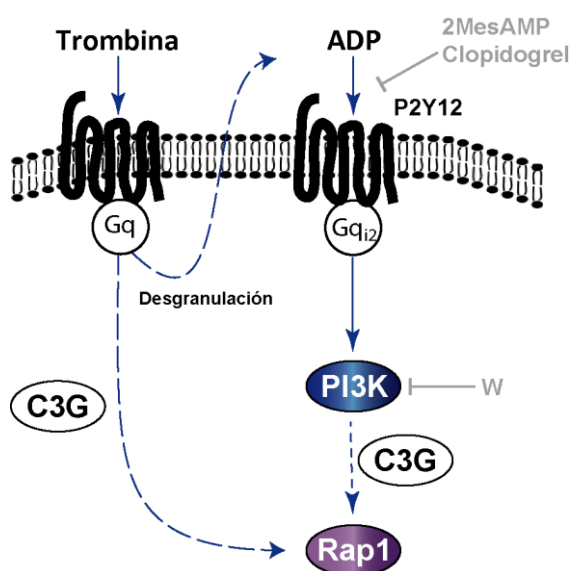


Figura D-2. Representación esquemática de la participación de C3G en la activación de Rap1 a través de la ruta ADP-P2Y12. C3G podría ser el GEF responsable de la activación de Rap1 mediada por PI3K en la ruta de activación inducida por el receptor de ADP, P2Y12 en plaquetas de ratón. PI3K: Fosfatidil inositol 3 kinasa, W: wortmanina.

Se ha descrito que en el proceso de desgranulación inducido por ADP el receptor P2Y12 sería el más relevante y en cambio, en el proceso de agregación, intervendrían tanto P2Y12 como P2Y1 (Dangelmaier *et al* 2000; Gachet 2001; Jin *et al* 2002). Consecuentemente, en nuestro sistema, el inhibidor del receptor P2Y1 (MRS2179) apenas mostró efecto sobre la desgranulación, mientras que sí indujo una potente inhibición de la agregación, como se muestra en la Figura R-17. Este hecho, junto con el débil efecto del ADP en la desgranulación (Figura R-8), puede ser la razón por la cual no hemos observado diferencias significativas en la inhibición, por MRS2179, de la desgranulación inducida por trombina entre las plaquetas de ratones tgC3G y sus controles (Figura R-20). Tampoco hemos encontrado diferencias en la

inhibición por MRS2179 de la activación de la integrina mediada por ADP, ni en la inhibición de la agregación inducida por trombina, posiblemente debido a su drástico efecto inhibitor (niveles de inhibición próximos al 100%) (Figuras R-21 y R-23). Únicamente hemos observado una inhibición diferencial por MRS2179 entre plaquetas tgC3G y plaquetas silvestres en cuanto a la activación de la integrina por trombina (Figura R-20). Puede haber dos posibles explicaciones no excluyentes, (i) que C3G esté participando como GEF de Rap1 vía P2Y1 a través de PKC, puesto que este receptor provoca la activación de PLC (Woulfe *et al* 2002), si bien la vía preferente sería por CalDAG-GEF1, o (ii) que la activación de la integrina por ADP se esté produciendo preferentemente vía P2Y1 en nuestro sistema de estudio, a diferencia de la desgranulación que sería más dependiente de la vía de P2Y12. En cualquier caso, no parece que C3G contribuya de manera relevante a la ruta ADP-P2Y1 y si lo haga en la ruta regulada por P2Y12.

6.5 C3G interviene en la regulación de la síntesis del tromboxano A₂.

La producción y liberación de TXA₂ es una de las principales consecuencias de la activación plaquetaria. La mayoría de agonistas plaquetarios conducen a la síntesis de TXA₂, cuyo paso limitante es la activación de la cPLA₂, la cual se regula por fosforilación en el residuo de serina 505 por MAPK, entre otros mecanismos (Borsch-Haubold *et al* 1998; Hackeng *et al* 2000a; Garcia *et al* 2005; Shankar *et al* 2006). Sin embargo, otros autores indican que las MAPK no tienen implicación en la síntesis del TXA₂ (Borsch-Haubold *et al* 1996; Kramer *et al* 1996; McNicol *et al* 2003). En este trabajo hemos comprobado que la expresión transgénica de C3G en plaquetas regula negativamente la síntesis de TXA₂. Este efecto se observa también en plaquetas tgC3GΔCat, si bien las diferencias con respecto a sus controles no son significativas (Figura R-28). Por otra parte, las plaquetas tgC3G mostraron una mayor sensibilidad al pretratamiento con aspirina (inhibidor de la ciclooxigenasa, una enzima clave en la ruta de la síntesis del TXA₂), que indujo valores de activación y agregación en respuesta tanto a trombina como a ADP, significativamente más bajos que en las plaquetas de ratones de genotipo silvestre (Figuras R-25, R-26 y R-27). Esta mayor sensibilidad al tratamiento con aspirina observada en las plaquetas tgC3G sugiere la participación de C3G en una ruta iniciada por la unión del TXA₂ a su receptor, donde la activación de C3G sería dependiente de esta ruta (Figura D-3). Está hipótesis está avalada por el efecto inhibitor de la aspirina sobre la fosforilación de C3G inducida por trombina, tal y como muestran los estudios de inmunofluorescencia de la Figura R-29. Cabe señalar que, tanto las plaquetas tgC3G como las tgC3GΔCat muestran mayores niveles de fosforilación en la Tyr504 inducidos por trombina, que sus correspondientes controles silvestres, lo que está de acuerdo con la presencia de dicha

tirosina en ambos transgenes. Esto explica que la fosforilación de C3G sea más sensible a la inhibición por aspirina en ambas plaquetas transgénicas con respecto a sus correspondientes plaquetas control. Por otra parte, el hecho de que C3G regule negativamente la producción de TXA₂ indica que C3G activaría una ruta inhibidora de la ruta de activación de la ciclooxigenasa, la cual actuaría de forma sinérgica con la aspirina en la inhibición de la formación de TXA₂.

Cabe mencionar que la mayor producción de TXA₂ observada en la línea 8A3 (wtC3GΔCat y tgC3GΔCat) con respecto a las líneas tgC3G es probablemente un reflejo del diferente fondo genético de estas dos líneas transgénicas.

6.6 C3G está regulado positivamente por ERK1/2 en un mecanismo dependiente de la tirosina fosfatasa Shp2

A pesar de las discrepancias en cuanto a la implicación de las MAPK en la ruta de síntesis del TXA₂, los resultados de este trabajo están a favor de un papel positivo, tanto de ERK1/2 como de p38 MAPK en las funciones de las plaquetas, ya que: (i) la trombina induce la fosforilación de ambas MAPK en plaquetas (Figura R-33); (ii) sus inhibidores respectivos U0126 y SB352080, producen una disminución en la activación y agregación plaquetaria inducida por trombina (Figura R-17). Estos resultados estarían en consonancia con otras publicaciones que indican la participación de estas MAPK en las vías de señalización plaquetaria (Papkoff *et al* 1994; Saklatvala *et al* 1996; Garcia *et al* 2007). Nuestros resultados sugieren también que ERK1/2 estarían reguladas por PKC en plaquetas (Figura R-33), en consonancia con la literatura, ya que se ha descrito que PKC es capaz de activar ERK1/2 en la ruta de síntesis de TXA₂ (Yacoub *et al* 2006). Por el contrario, nuestros resultados indican que la ruta ADP-P2Y₁₂ no es muy relevante en la activación de ERK1/2 o p38 MAPK, en contradicción con otras publicaciones (Garcia *et al* 2007; Adam *et al* 2008). Por otra parte, la mayor sensibilidad de las plaquetas tgC3G a ambos inhibidores sugiere la participación de C3G en las rutas plaquetarias reguladas por estas MAPK (Figuras R-30, R-31 y R-32). De hecho, la fosforilación de C3G en la Tyr504 inducida por trombina se inhibe drásticamente en presencia de U0126 y SB352080, lo que proporciona una explicación a la mayor sensibilidad a estos inhibidores observada en los experimentos de activación y agregación plaquetaria. Estos resultados indican la existencia de una regulación positiva de estas MAPK sobre C3G. Dado que ERK1/2 y p38 MAPK son Ser/Thr kinasas y que esta regulación sobre C3G implica la fosforilación/desfosforilación de un residuo de tirosina, se planteaban dos posibles mecanismos de regulación: (i) o bien las MAPK están regulando positivamente una tirosina kinasa que fosforila a C3G, (ii) o bien estas MAPK regulan negativamente una tirosina fosfatasa implicada en la desfosforilación de la Tyr504 de C3G. Dado que Src es una de las principales tirosina kinasa implicadas en la fosforilación de C3G en diferentes tipos celulares (Ichiba *et al* 1999; Ling *et al* 2003; Shivakrupa *et al* 2003; Radha *et al* 128

a/2004; Radha *et al* 2011), junto con el hecho de que Src fosforila y activa a la PLC γ_2 provocando la activación de la ruta MEK-ERK-cPLA $_2$ implicada en la síntesis del TXA $_2$ (Garcia *et al* 2005), Src podría ser la kinasa regulada por ERK1/2 en nuestro sistema. Sin embargo, si bien Src es responsable, también en plaquetas, de la fosforilación de C3G (Figura R-35), su activación por fosforilación no está regulada por ERK1/2. El otro mecanismo alternativo implicaba la regulación, por parte de ERK1/2, de una tirosina fosfatasa. En efecto, este parece ser el mecanismo de regulación, ya que la inhibición de la fosforilación de C3G (sobre todo en las plaquetas tgC3G) inducida por pretratamiento con el inhibidor de ERK1/2 U0126, se revierte completamente en presencia de SHP99 (Figura R-36), un inhibidor selectivo de la tirosina fosfatasa Shp2 que, por tanto, sería la responsable de esta regulación.

Un hecho sorprendente es que el clopidogrel estimula por sí sólo la fosforilación de p38 MAPK, posiblemente a través de la regulación negativa de inhibidores de estas MAPK. En concordancia con estas observaciones, se ha descrito que el clopidogrel es capaz de inhibir el crecimiento de células del epitelio gástrico, provocando su apoptosis a través de un incremento en la fosforilación de MAPK como p38 MAPK, ERK1/2 y JNK (Wu *et al* 2013).

En conjunto, estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo de regulación positiva de C3G mediado por ERK1/2 a través de la inhibición de Shp2, que estaría indirectamente implicado en la fosforilación de C3G por trombina en el residuo de Tyr504. Un hecho curioso es que ERK1/2 regula negativamente a CalDAG-GEFI (Ren *et al* 2016), lo que plantea la hipótesis de que ERK1/2 podría regular positiva o negativamente la actividad de Rap1 a través de la modulación de sus GEF. Esta regulación negativa de Shp2 por parte de ERK1/2 se ha observado también en células PC12 (Peraldi *et al* 1994). La regulación de C3G por Shp2 está avalada por la mayor co-localización de ambas proteínas observada en condiciones de inhibición de ERK1/2, es decir, cuando la actividad de Shp2 es máxima (Figura R-37). Esta interacción entre ambas proteínas en presencia del inhibidor de ERK1/2 permitiría la desfosforilación de C3G, la cual resultaría en una disminución de los niveles de Rap1 activado, tal y como se observa en la Figura R-38. Dichos niveles se recuperan en presencia de SHP099, lo que apoya la hipótesis propuesta.

Todos estos resultados, junto con los resultados que implican a C3G en la ruta de síntesis del TXA $_2$, nos llevan a proponer un modelo de regulación de esta ruta en el cual las MAPK estarían regulando la activación de Rap1 a través de la síntesis de TXA $_2$ y la consiguiente activación de C3G. El modelo de regulación de Rap1 por la producción y liberación de TXA $_2$ dependiente de p38 MAPK, y la posterior estimulación de su receptor TXA $_2$ R, ya ha sido propuesto por otros autores (Hackeng *et al* 1999). Nosotros proponemos que C3G sería el GEF responsable de la activación de Rap1 dependiente de la activación del receptor de TXA $_2$. Tras su activación Rap1 regularía negativamente la activación de las MAPK en un mecanismo

de retroalimentación negativa que ha sido descrito en otros tipos celulares (Stork 2003; Maia *et al* 2009). La inhibición de las MAPK resultaría en disminución en la síntesis de TXA₂ y por tanto, explicaría la menor producción de TXA₂ encontrada en las plaquetas transgénicas C3G (Figura R-28). En este modelo, C3G estaría, además, regulado positivamente por las MAPK a través de la inhibición de la tirosina fosfatasa Shp2 (Figura D-3).

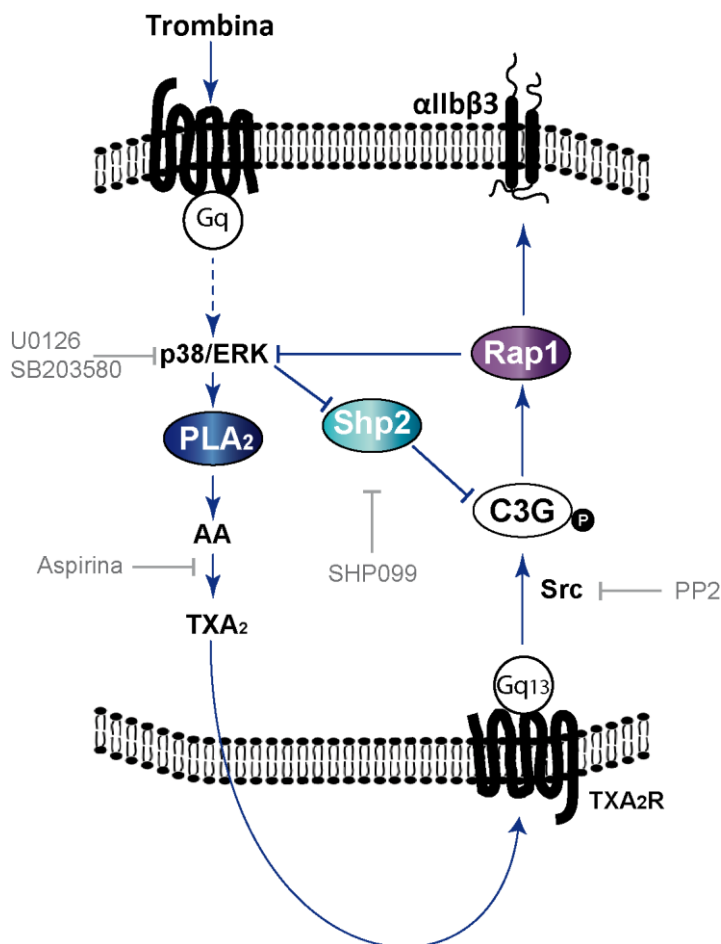


Figura D-3. Representación esquemática de la participación de C3G en la ruta síntesis y señalización del TXA₂. En plaquetas de ratón la activación de C3G estaría regulada, tanto por la síntesis del TXA₂ como por ERK1/2 a través de la tirosina fosfatasa Shp2. C3G fosforilado participaría en la activación de Rap1, regulando la ruta a nivel de las MAPK mediante un mecanismo de retroalimentación negativo. PLA₂: Fosfolipasa A₂, TXA₂R: receptor de TXA₂, TXA₂: Tromboxano A₂, PP2: inhibidor de Src. SHP099: inhibidor de Shp2. U0126: inhibidor de ERK; SB203580: inhibidor de p38; aspirina: inhibidor de la ciclooxygenasa.

En resumen, este trabajo muestra un papel importante de C3G en la regulación de la función de las plaquetas a través de vías de regulación de Rap1 alternativas a CalDAG-GEFI, abriendo nuevas perspectivas de estudio sobre C3G como diana terapéutica en los desórdenes

trombóticos. También hemos podido identificar una nueva relación entre MAPK y C3G en las rutas de señalización por TXA_2 . Los modelos de ratones transgénicos C3G podrían ser usados para evaluar el papel potencial que juega C3G en el desarrollo de enfermedades hemostáticas, así como para evaluar la posible función de C3G en el desarrollo de los neutrófilos y su relación con la LMC.

CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

1. C3G desempeña un papel importante en la función hemostática de las plaquetas, mediante la regulación de su actividad, pero sin alterar su número en sangre circulante.
2. La sobreexpresión de C3G en plaquetas induce un aumento del número de neutrófilos en sangre, posiblemente por interacción de éstos con la P-selectina, cuya expresión en superficie está incrementada en las plaquetas transgénicas C3G.
3. C3G regula la desgranulación de las plaquetas y la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ en respuesta a trombina, ADP, PMA y colágeno, a través de la activación de su diana Rap1.
4. C3G participa en la ruta trombina-PKC, que activa a Rap1 de forma independiente de CalDAG-GEFI.
5. La tirosina kinasa Src fosforila a C3G en la Tyr504 en respuesta a la activación por trombina, posiblemente a través de un mecanismo mediado por PKC.
6. C3G participa como GEF de Rap1 en la vía ADP-P2Y₁₂-PI3K que conduce a la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y a la desgranulación plaquetaria.
7. C3G es un mediador de la ruta trombina-TXA₂ que conduce a la activación plaquetaria, pero regula negativamente la síntesis de TXA₂.
8. La fosforilación de C3G en la Tyr504, inducida por trombina, está regulada positivamente por ERK1/2 a través de la inhibición de la tirosina fosfatasa Shp2.

BIBLIOGRAFÍA

8 BIBLIOGRAFÍA

- Adam F, Kauskot A, Rosa JP, Bryckaert M (2008) Mitogen-activated protein kinases in hemostasis and thrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis* : JTH 6:2007-16
- Allende M (2012) Identificación y caracterización funcional de nuevos genes implicados en el ictus cardioembólico. Tesis Doctoral. Universidad de Navarra.
- Arai A, Nosaka Y, Kohsaka H, Miyasaka N, Miura O (1999) CrkL activates integrin-mediated hematopoietic cell adhesion through the guanine nucleotide exchange factor C3G. *Blood* 93:3713-22
- Arita H, Nakano T, Hanasaki K (1989) Thromboxane A2: its generation and role in platelet activation. *Progress in lipid research* 28:273-301
- Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kehrel B, Offermanns S, Fassler R (1999) The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *The EMBO journal* 18:37-48
- Barford D, Neel BG (1998) Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure* 6:249-54
- Bellamy TC, Garthwaite J (2002) The receptor-like properties of nitric oxide-activated soluble guanylyl cyclase in intact cells. *Molecular and cellular biochemistry* 230:165-76
- Ben Shimon M, Lenz M, Ikenberg B, Becker D, Shavit Stein E, Chapman J, Tanne D, Pick CG, Blatt I, Neufeld M, Vlachos A, Maggio N (2015) Thrombin regulation of synaptic transmission and plasticity: implications for health and disease. *Frontiers in cellular neuroscience* 9:151
- Bennett JS, Vilaire G (1979) Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J Clin Invest* 64:1393-401
- Benz PM, Laban H, Zink J, Gunther L, Walter U, Gambaryan S, Dib K (2016) Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein (VASP)-dependent and -independent pathways regulate thrombin-induced activation of Rap1b in platelets. *Cell communication and signaling* : CCS 14:21
- Bergmeier W, Schulte V, Brockhoff G, Bier U, Zirngibl H, Nieswandt B (2002) Flow cytometric detection of activated mouse integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ with a novel monoclonal antibody. *Cytometry* 48:80-6
- Bergmeier W, Goerge T, Wang HW, Crittenden JR, Baldwin AC, Cifuni SM, Housman DE, Graybiel AM, Wagner DD (2007) Mice lacking the signaling molecule CalDAG-GEFI represent a model for leukocyte adhesion deficiency type III. *J Clin Invest* 117:1699-707
- Berridge MJ (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315-25
- Bertoni A, Tadokoro S, Eto K, Pampori N, Parise LV, White GC, Shattil SJ (2002) Relationships between Rap1b, affinity modulation of integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 277:25715-21
- Boguski MS, McCormick F (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366:643-54
- Boriack-Sjodin PA, Margarit SM, Bar-Sagi D, Kuriyan J (1998) The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* 394:337-43
- Borsch-Haubold AG, Kramer RM, Watson SP (1996) Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase does not impair primary activation of human platelets. *The Biochemical journal* 318 (Pt 1):207-12
- Borsch-Haubold AG, Kramer RM, Watson SP (1997) Phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by 38-kDa mitogen-activated protein kinase in collagen-stimulated human platelets. *European journal of biochemistry* 245:751-9

- Borsch-Haubold AG, Bartoli F, Asselin J, Dudler T, Kramer RM, Apitz-Castro R, Watson SP, Gelb MH (1998) Identification of the phosphorylation sites of cytosolic phospholipase A2 in agonist-stimulated human platelets and HeLa cells. *The Journal of biological chemistry* 273:4449-58
- Börsch-Haubold AG, Pasquet S, Watson SP (1998) Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by the kinase inhibitors SB 203580 and PD 98059. *J Biol Chem* 273:28766-72
- Bos JL (1998) All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO J* 17:6776-82
- Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129:865-77
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54
- Brandt DT, Goerke A, Heuer M, Gimona M, Leitges M, Kremmer E, Lammers R, Haller H, Mischak H (2003) Protein kinase C delta induces Src kinase activity via activation of the protein tyrosine phosphatase PTP alpha. *The Journal of biological chemistry* 278:34073-8
- Brass LF, Joseph SK (1985) A role for inositol triphosphate in intracellular Ca²⁺ mobilization and granule secretion in platelets. *J Biol Chem* 260:15172-151729
- Brass LF, Vassallo RR, Jr., Belmonte E, Ahuja M, Cichowski K, Hoxie JA (1992) Structure and function of the human platelet thrombin receptor. Studies using monoclonal antibodies directed against a defined domain within the receptor N terminus. *J Biol Chem* 267:13795-8
- Bugaud F, Nadal-Wollbold F, Levy-Toledano S, Rosa JP, Bryckaert M (1999) Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets. *Blood* 94:3800-5
- Burkhart JM, Vaudel M, Gambaryan S, Radau S, Walter U, Martens L, Geiger J, Sickmann A, Zahedi RP (2012) The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* 120:e73-82
- Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U (1994) cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *The Journal of biological chemistry* 269:14509-17
- Camonis JH, Kalekine M, Gondre B, Garreau H, Boy-Marcotte E, M. J (1986) Characterization, cloning and sequence analysis of the CDC25 gene which controls the cyclic AMP level of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 5:375-80.
- Cattaneo M, Canciani MT, Lecchi A, Kinlough-Rathbone RL, Packham MA, Mannucci PM, Mustard JF (1990) Released adenosine diphosphate stabilizes thrombin-induced human platelet aggregates. *Blood* 75:1081-6
- Cesarman-Maus G, Hajjar KA (2005) Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British journal of haematology* 129:307-21
- Cifuni SM, Wagner DD, Bergmeier W (2008) CalDAG-GEFI and protein kinase C represent alternative pathways leading to activation of integrin alphaIIb beta3 in platelets. *Blood* 112:1696-703
- Clemetson KJ, Clemetson JM (2001) Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* 86:189-97
- Cockcroft S, Thomas GM (1992) Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochem J* 288 (Pt 1):1-14
- Coller BS, Shattil SJ (2008) The GPIIb/IIIa (integrin alphaIIb beta3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood* 112:3011-25
- Coughlin SR (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407:258-64
- Crittenden JR, Bergmeier W, Zhang Y, Piffath CL, Liang Y, Wagner DD, Housman DE, Graybiel AM (2004) CalDAG-GEFI integrates

- signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nat Med* 10:982-6
- Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37-40
- Charles S Abrams (2012) Platelet Biology. Uptodate
- Chen J, Parsons S, Brautigan DL (1994) Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* 269:7957-62
- Chen M, Stracher A (1989) In situ phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain. *The Journal of biological chemistry* 264:14282-9
- Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, Macara IG, Pessin JE, Saltiel AR (2001) Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 410:944-8
- Chiang SH, Chang L, Saltiel AR (2006) TC10 and insulin-stimulated glucose transport. *Methods Enzymol* 406:701-14
- Chiang TM (1993) The role of protein phosphatases 1 and 2A in collagen-platelet interaction. *Archives of biochemistry and biophysics* 302:56-63
- Chrzanowska-Wodnicka M, Smyth SS, Schoenwaelder SM, Fischer TH, White GC (2005) Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice. *J Clin Invest* 115:680-7
- Dangelmaier C, Jin J, Daniel JL, Smith JB, Kunapuli SP (2000) The P2Y1 receptor mediates ADP-induced p38 kinase-activating factor generation in human platelets. *Eur J Biochem* 267:2283-9
- de Bruyn KM, Zwartkruis FJ, de Rooij J, Akkerman JW, Bos JL (2003) The small GTPase Rap1 is activated by turbulence and is involved in integrin [alpha]IIb[beta]3-mediated cell adhesion in human megakaryocytes. *The Journal of biological chemistry* 278:22412-7
- De Cuyper IM, Meinders M, van de Vijver E, de Korte D, Porcelijn L, de Haas M, Eble JA, Seeger K, Rutella S, Pagliara D, Kuijpers TW, Verhoeven AJ, van den Berg TK, Gutierrez L (2013) A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay. *Blood* 121:e70-80
- Deevi RK, Koney-Dash M, Kissenpfennig A, Johnston JA, Schuh K, Walter U, Dib K (2010) Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates inside-out signaling of beta2 integrins in neutrophils. *J Immunol* 184:6575-84
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26:3279-90
- Dumlao DS, Buczynski MW, Norris PC, Harkewicz R, Dennis EA (2011) High-throughput lipidomic analysis of fatty acid derived eicosanoids and N-acylethanolamines. *Biochimica et biophysica acta* 1811:724-36
- Ebinu JO, Bottorff DA, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ, Stone JC (1998) RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280:1082-6
- Eto K, Murphy R, Kerrigan SW, Bertoni A, Stuhlmann H, Nakano T, Leavitt AD, Shattil SJ (2002) Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12819-24
- Fam NP, Fan W-T, Wang Z, Zhang L-J, Chen H, Moran MF (1997) Cloning and characterization of Ras-GRF2, a novel guanine nucleotide exchange factor for Ras. *Mol Cell Biol* 17:1396-406
- Feller SM, Knudsen B, Hanafusa H (1995) Cellular proteins binding to the first Src homology 3 (SH3) domain of the proto-oncogene product c-Crk indicate Crk-specific signaling pathways. *Oncogene* 10:1465-73
- Ferrando IM, Chaerkady R, Zhong J, Molina H, Jacob HK, Herbst-Robinson K, Dancy BM, Katju V, Bose R, Zhang J, Pandey A, Cole

- PA (2012) Identification of targets of c-Src tyrosine kinase by chemical complementation and phosphoproteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 11:355-69
- Fox JE, Berndt MC (1989) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of glycoprotein Ib inhibits collagen-induced polymerization of actin in platelets. *The Journal of biological chemistry* 264:9520-6
- Franke B, Akkerman JW, Bos JL (1997) Rapid Ca²⁺-mediated activation of Rap1 in human platelets. *EMBO J* 16:252-9
- Franke B, van Triest M, de Bruijn KM, van Willigen G, Nieuwenhuis HK, Negrier C, Akkerman JW, Bos JL (2000) Sequential regulation of the small GTPase Rap1 in human platelets. *Mol Cell Biol* 20:779-85
- Furie B, Furie BC (2008) Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine* 359:938-49
- Furie B, Furie BC (2012) Formation of the clot. *Thrombosis research* 130 Suppl 1:S44-6
- Gachet C, Stierlé A, Ohlmann P, Lanza F, Hanau D, Cazenave JP (1991) Normal ADP-induced aggregation and absence of dissociation of the membrane GP IIb-IIIa complex of intact rat platelets pretreated with EDTA. *Thromb Haemost* 66:246-53
- Gachet C (2001) Identification, characterization, and inhibition of the platelet ADP receptors. *International journal of hematology* 74:375-81
- Garcia A, Quinton TM, Dorsam RT, Kunapuli SP (2005) Src family kinase-mediated and Erk-mediated thromboxane A₂ generation are essential for VWF/GPIb-induced fibrinogen receptor activation in human platelets. *Blood* 106:3410-4
- Garcia A, Shankar H, Murugappan S, Kim S, Kunapuli SP (2007) Regulation and functional consequences of ADP receptor-mediated ERK2 activation in platelets. *The Biochemical journal* 404:299-308
- Geiger J, Nolte C, Walter U (1994) Regulation of calcium mobilization and entry in human platelets by endothelium-derived factors. *The American journal of physiology* 267:C236-44
- Gómez-Hernandez, M (2014). Caracterización de la organización estructural del factor de intercambio de nucleótido de guanina C3G. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Gorman RR, Bunting S, Miller OV (1977) Modulation of human platelet adenylate cyclase by prostacyclin (PGX). *Prostaglandins* 13:377-88
- Gotoh T, Hattori S, Nakamura S, Kitayama H, Noda M, Takai Y, Kaibuchi K, Matsui H, Hatase O, Takahashi H, et al. (1995) Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor C3G. *Mol Cell Biol* 15:6746-53
- Gotoh T, Niino Y, Tokuda M, Hatase O, Nakamura S, Matsuda M, Hattori S (1997) Activation of R-Ras by Ras-guanine nucleotide-releasing factor. *J Biol Chem* 272:18602-7
- Grumbach IM, Mayer IA, Uddin S, Lekmine F, Majchrzak B, Yamauchi H, Fujita S, Druker B, Fish EN, Platanias LC (2001) Engagement of the CrkL adaptor in interferon alpha signalling in BCR-ABL-expressing cells. *Br J Haematol* 112:327-36
- Gual P, Shigematsu S, Kanzaki M, Gremeaux T, Gonzalez T, Pessin JE, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF (2002) A Crk-II/TC10 signaling pathway is required for osmotic shock-stimulated glucose transport. *J Biol Chem* 277:43980-6
- Guerrero C, Fernandez-Medarde A, Rojas JM, Font de Mora J, Esteban LM, Santos E (1998) Transformation suppressor activity of C3G is independent of its CDC25-homology domain. *Oncogene* 16:613-24
- Guerrero C, Martin-Encabo S, Fernandez-Medarde A, Santos E (2004) C3G-mediated suppression of oncogene-induced focus formation in fibroblasts involves inhibition of ERK activation, cyclin A expression and alterations of anchorage-independent growth. *Oncogene* 23:4885-93
- Guidetti GF, Manganaro D, Consonni A, Canobbio I, Balduini C, Torti M (2013) Phosphorylation of the guanine-nucleotide-

- exchange factor CalDAG-GEFI by protein kinase A regulates Ca^{2+} -dependent activation of platelet Rap1b GTPase. *The Biochemical journal* 453:115-23
- Gutierrez-Berzal J, Castellano E, Martin-Encabo S, Gutierrez-Cianca N, Hernandez JM, Santos E, Guerrero C (2006) Characterization of p87C3G, a novel, truncated C3G isoform that is overexpressed in chronic myeloid leukemia and interacts with Bcr-Abl. *Exp Cell Res* 312:938-48
- Gutiérrez-Uzquiza A, Arechederra M, Molina I, Baños R, Maia V, Benito M, Guerrero C, Porras A (2010) C3G down-regulates p38 MAPK activity in response to stress by Rap-1 independent mechanisms: Involvement in cell death. *Cellular signalling* 22:533-42
- Hackeng CM, Pladet MW, Akkerman JW, van Rijn HJ (1999) Low density lipoprotein phosphorylates the focal adhesion-associated kinase p125(FAK) in human platelets independent of integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$. *J Biol Chem* 274:384-8
- Hackeng CM, Franke B, Relou IA, Gorter G, Bos JL, van Rijn HJ, Akkerman JW (2000a) Low-density lipoprotein activates the small GTPases Rap1 and Ral in human platelets. *The Biochemical journal* 349:231-8
- Hackeng CM, Franke B, Relou IA, Gorter G, Bos JL, van Rijn HJ, Akkerman JW (2000b) Low-density lipoprotein activates the small GTPases Rap1 and Ral in human platelets. *Biochem J* 349:231-8
- Halenda SP, Banga HS, Zavoico GB, Lau LF, Feinstein MB (1989) Synergistic release of arachidonic acid from platelets by activators of protein kinase C and Ca^{2+} ionophores. Evidence for the role of protein phosphorylation in the activation of phospholipase A2 and independence from the Na^+/H^+ exchanger. *Biochemistry* 28:7356-63
- Hall KJ, Jones ML, Poole AW (2007) Coincident regulation of PKC δ in human platelets by phosphorylation of Tyr311 and Tyr565 and phospholipase C signalling. *The Biochemical journal* 406:501-9
- Harper MT, Mason MJ, Sage SO, Harper AG (2010a) Phorbol ester-evoked Ca^{2+} signaling in human platelets is via autocrine activation of P(2X1) receptors, not a novel non-capacitative Ca^{2+} entry. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 8:1604-13
- Harper MT, Poole AW (2010b) Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. *J Thromb Haemost* 8:454-62
- Hathaway DR, Eaton CR, Adelstein RS (1981) Regulation of human platelet myosin light chain kinase by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Nature* 291:252-6
- Hirata M, Hayashi Y, Ushikubi F, Yokota Y, Kageyama R, Nakanishi S, Narumiya S (1991) Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A2 receptor. *Nature* 349:617-20
- Hof P, Pluskey S, Dhe-Paganon S, Eck MJ, Shoelson SE (1998) Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell* 92:441-50
- Hogan C, Serpente N, Cogram P, Hosking CR, Bialucha CU, Feller SM, Braga VM, Birchmeier W, Fujita Y (2004) Rap1 regulates the formation of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Molecular and cellular biology* 24:6690-700
- Holtkotter O, Nieswandt B, Smyth N, Muller W, Hafner M, Schulte V, Krieg T, Eckes B (2002) Integrin $\alpha 2$ -deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *The Journal of biological chemistry* 277:10789-94
- Hong KW, Jin HS, Lim JE, Ryu HJ, Go MJ, Lee JY, Woo JT, Park HK, Oh B (2009) RAPGEF1 gene variants associated with type 2 diabetes in the Korean population. *Diabetes research and clinical practice* 84:117-22
- Ichiba T, Kuraishi Y, Sakai O, Nagata S, Groffen J, Kurata T, Hattori S, Matsuda M (1997) Enhancement of guanine-nucleotide exchange activity of C3G for Rap1 by the expression of Crk, CrkL, and Grb2. *The Journal of biological chemistry* 272:22215-20
- Ichiba T, Hashimoto Y, Nakaya M, Kuraishi Y, Tanaka S, Kurata T, Mochizuki N, Matsuda

- M (1999) Activation of C3G guanine nucleotide exchange factor for Rap1 by phosphorylation of tyrosine 504. *The Journal of biological chemistry* 274:14376-81
- Inoue M, Kishimoto A, Takai Y, Nishizuka Y (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *The Journal of biological chemistry* 252:7610-6
- Ishimaru S, Williams R, Clark E, Hanafusa H, Gaul U (1999) Activation of the Drosophila C3G leads to cell fate changes and overproliferation during development, mediated by the RAS-MAPK pathway and RAP1. *The EMBO journal* 18:145-55
- Jacquel A, Herrant M, Legros L, Belhacene N, Luciano F, Pages G, Hofman P, Auberger P (2003) Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the Bcr-Abl-positive K562 cell line and its differentiation toward the erythroid lineage. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17:2160-2
- Jin J, Quinton TM, Zhang J, Rittenhouse SE, Kunapuli SP (2002) Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane A(2) generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin alpha(IIb)beta(3) and ADP receptors. *Blood* 99:193-8
- Jung SM, Ohnuma M, Watanabe N, Sonoda M, Handa M, Moroi M (2006) Analyzing the mechanism of Rap1 activation in platelets: Rap1 activation is related to the release reaction mediated through the collagen receptor GPVI. *Thrombosis research* 118:509-21
- Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV, Jr., Tam C, Coughlin SR (1998) A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394:690-4
- Kaibuchi K, Takai Y, Sawamura M, Hoshijima M, Fujikura T, Nishizuka Y (1983) Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation. *The Journal of biological chemistry* 258:6701-4
- Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE (2001) Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry* 276:18169-77
- Kauffenstein G, Bergmeier W, Eckly A, Ohlmann P, Leon C, Cazenave JP, Nieswandt B, Gachet C (2001) The P2Y(12) receptor induces platelet aggregation through weak activation of the alpha(IIb)beta(3) integrin--a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS letters* 505:281-90
- Kirsch KH, Georgescu MM, Hanafusa H (1998) Direct binding of p130(Cas) to the guanine nucleotide exchange factor C3G. *The Journal of biological chemistry* 273:25673-9
- Knudsen BS, Feller SM, Hanafusa H (1994) Four proline-rich sequences of the guanine-nucleotide exchange factor C3G bind with unique specificity to the first Src homology 3 domain of Crk. *The Journal of biological chemistry* 269:32781-7
- Knudsen BS, Zheng J, Feller SM, Mayer JP, Burrell SK, Cowburn D, Hanafusa H (1995) Affinity and specificity requirements for the first Src homology 3 domain of the Crk proteins. *The EMBO journal* 14:2191-8
- Kolch W (2005) Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nature reviews Molecular cell biology* 6:827-37
- Komiyama Y, Pedersen AH, Kisiel W (1990) Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor. *Biochemistry* 29:9418-25
- Konopatskaya O, Gilio K, Harper MT, Zhao Y, Cosemans JM, Karim ZA, Whiteheart SW, Molkentin JD, Verkade P, Watson SP, Heemskerk JW, Poole AW (2009) PKCalpha regulates platelet granule secretion and thrombus formation in mice. *The Journal of clinical investigation* 119:399-407
- Kostyak JC, Liverani E, Kunapuli SP (2017) PKC-epsilon deficiency alters progenitor cell populations in favor of megakaryopoiesis. *PloS one* 12:e0182867

- Kramer RM, Roberts EF, Hyslop PA, Utterback BG, Hui KY, Jakubowski JA (1995) Differential activation of cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) by thrombin and thrombin receptor agonist peptide in human platelets. Evidence for activation of cPLA2 independent of the mitogen-activated protein kinases ERK1/2. *The Journal of biological chemistry* 270:14816-23
- Kramer RM, Roberts EF, Um SL, Borsch-Haubold AG, Watson SP, Fisher MJ, Jakubowski JA (1996) p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *The Journal of biological chemistry* 271:27723-9
- Kuliopulos A, Mohanlal R, Covic L (2004) Effect of selective inhibition of the p38 MAP kinase pathway on platelet aggregation. *Thrombosis and haemostasis* 92:1387-93
- Kunapuli SP, Dorsam RT, Kim S, Quinton TM (2003) Platelet purinergic receptors. *Curr Opin Pharmacol* 3:175-80
- Lapetina EG, Billah MM, Cuatrecasas P (1981) Lysophosphatidic acid potentiates the thrombin-induced production of arachidonate metabolites in platelets. *The Journal of biological chemistry* 256:11984-7
- Larson MK, Chen H, Kahn ML, Taylor AM, Fabre JE, Mortensen RM, Conley PB, Parise LV (2003) Identification of P2Y12-dependent and -independent mechanisms of glycoprotein VI-mediated Rap1 activation in platelets. *Blood* 101:1409-15
- Li Y, Yan J, De P, Chang HC, Yamauchi A, Christopherson KW, 2nd, Paranjayana NC, Peng X, Kim C, Munugalavada V, Kapur R, Chen H, Shou W, Stone JC, Kaplan MH, Dinanier MC, Durden DL, Quilliam LA (2007) Rap1a null mice have altered myeloid cell functions suggesting distinct roles for the closely related Rap1a and 1b proteins. *J Immunol* 179:8322-31
- Li Z, Xi X, Du X (2001) A mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway in the activation of platelet integrin alpha IIb beta3. *The Journal of biological chemistry* 276:42226-32
- Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X (2010) Signaling during platelet adhesion and activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30:2341-9
- Lian L, Wang Y, Flick M, Choi J, Scott EW, Degen J, Lemmon MA, Abrams CS (2009) Loss of pleckstrin defines a novel pathway for PKC-mediated exocytosis. *Blood* 113:3577-84
- Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72:269-78
- Ling L, Zhu T, Lobie PE (2003) Src-CrkII-C3G-dependent activation of Rap1 switches growth hormone-stimulated p44/42 MAP kinase and JNK/SAPK activities. *The Journal of biological chemistry* 278:27301-11
- Lova P, Paganini S, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M (2002) A Gi-dependent pathway is required for activation of the small GTPase Rap1B in human platelets. *The Journal of biological chemistry* 277:12009-15
- M'Rabet L, Coffey P, Zwartkruis F, Franke B, Segal AW, Koenderman L, Bos JL (1998) Activation of the small GTPase rap1 in human neutrophils. *Blood* 92:2133-40
- Maia V, Sanz M, Gutierrez-Berzal J, de Luis A, Gutierrez-Uzquiza A, Porras A, Guerrero C (2009) C3G silencing enhances STI-571-induced apoptosis in CML cells through p38 MAPK activation, but it antagonizes STI-571 inhibitory effect on survival. *Cellular signalling* 21:1229-35
- Maia V, Ortiz-Rivero S, Sanz M, Gutierrez-Berzal J, Alvarez-Fernandez I, Gutierrez-Herrero S, de Pereda JM, Porras A, Guerrero C (2013) C3G forms complexes with Bcr-Abl and p38alpha MAPK at the focal adhesions in chronic myeloid leukemia cells: implication in the regulation of leukemic cell adhesion. *Cell communication and signaling : CCS* 11:9
- Mann KG, Krishnaswamy S, Lawson JH (1992) Surface-dependent hemostasis. *Seminars in hematology* 29:213-26
- Margarit SM, Sonderegger H, Hall BE, Nagar B, Hoelz A, Pirruccello M, Bar-Sagi D, Kuriyan J (2003) Structural evidence for feedback

- activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell* 112:685-95
- Martin-Encabo S, Santos E, Guerrero C (2007) C3G mediated suppression of malignant transformation involves activation of PP2A phosphatases at the subcortical actin cytoskeleton. *Experimental cell research* 313:3881-91
- Martin-Granado V, Ortiz-Rivero S, Carmona R, Gutierrez-Herrero S, Barrera M, San-Segundo L, Sequera C, Perdiguero P, Lozano F, Martin-Herrero F, Gonzalez-Porras JR, Munoz-Chapuli R, Porras A, Guerrero C (2017) C3G promotes a selective release of angiogenic factors from activated mouse platelets to regulate angiogenesis and tumor metastasis. *Oncotarget* 8:110994-1011
- Matsuda M, Tanaka S, Nagata S, Kojima A, Kurata T, Shibuya M (1992) Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities. *Molecular and cellular biology* 12:3482-9
- Mazharian A, Roger S, Maurice P, Berrou E, Popoff MR, Hoylaerts MF, Fauvel-Lafeve F, Bonnefoy A, Bryckaert M (2005) Differential Involvement of ERK2 and p38 in platelet adhesion to collagen. *The Journal of biological chemistry* 280:26002-10
- Mazharian A, Mori J, Wang YJ, Heising S, Neel BG, Watson SP, Senis YA (2013) Megakaryocyte-specific deletion of the protein-tyrosine phosphatases Shp1 and Shp2 causes abnormal megakaryocyte development, platelet production, and function. *Blood* 121:4205-20
- McNicol A, Jackson EC (2003) Inhibition of the MEK/ERK pathway has no effect on agonist-induced aggregation of human platelets. *Biochemical pharmacology* 65:1243-50
- Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI (2001) Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation* 104:1533-7
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* 16:1215
- Mochizuki N, Ohba Y, Kobayashi S, Otsuka N, Graybiel AM, Tanaka S, Matsuda M (2000) Crk activation of JNK via C3G and R-Ras. *The Journal of biological chemistry* 275:12667-71
- Moers A, Nieswandt B, Massberg S, Wettschreck N, Gruner S, Konrad I, Schulte V, Aktas B, Gratacap MP, Simon MI, Gawaz M, Offermanns S (2003) G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Nature medicine* 9:1418-22
- Moscardo A, Valles J, Pinon M, Aznar J, Martinez-Sales V, Santos MT (2006) Regulation of cytosolic PIA2 activity by PP1/PP2A serine/threonine phosphatases in human platelets. *Platelets* 17:405-15
- Mosesson MW (2005) Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 3:1894-904
- Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S, Kimura H (1978) Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Advances in cyclic nucleotide research* 9:145-58
- Murugappan S, Tuluc F, Dorsam RT, Shankar H, Kunapuli SP (2004) Differential role of protein kinase C delta isoform in agonist-induced dense granule secretion in human platelets. *The Journal of biological chemistry* 279:2360-7
- Murugappan S, Shankar H, Bhamidipati S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP (2005) Molecular mechanism and functional implications of thrombin-mediated tyrosine phosphorylation of PKCdelta in platelets. *Blood* 106:550-7
- Nadal-Wollbold F, Pawlowski M, Levy-Toledano S, Berrou E, Rosa JP, Bryckaert M (2002) Platelet ERK2 activation by thrombin is dependent on calcium and conventional protein kinases C but not Raf-1 or B-Raf. *FEBS letters* 531:475-82

- Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR (2000) PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* 404:609-13
- Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6:3051-64
- Nemenoff RA, Winitz S, Qian NX, Van Putten V, Johnson GL, Heasley LE (1993) Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A2 by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C. *The Journal of biological chemistry* 268:1960-4
- Nieswandt B, Moser M, Pleines I, Varga-Szabo D, Monkley S, Critchley D, Fassler R (2007) Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine* 204:3113-8
- Nieswandt B, Varga-Szabo D, Elvers M (2009) Integrins in platelet activation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7 Suppl 1:206-9
- Nishizuka Y (1986) Perspectives on the role of protein kinase C in stimulus-response coupling. *Journal of the National Cancer Institute* 76:363-70
- Nishizuka Y (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334:661-5
- Oda T, Heaney C, Hagopian JR, Okuda K, Griffin JD, Druker BJ (1994) Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *The Journal of biological chemistry* 269:22925-8
- Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI (1997) Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature* 389:183-6
- Offermanns S (2000) The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation. *Biological chemistry* 381:389-96
- Ohba Y, Mochizuki N, Yamashita S, Chan AM, Schrader JW, Hattori S, Nagashima K, Matsuda M (2000) Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *The Journal of biological chemistry* 275:20020-6
- Ohba Y, Ikuta K, Ogura A, Matsuda J, Mochizuki N, Nagashima K, Kurokawa K, Mayer BJ, Maki K, Miyazaki J, Matsuda M (2001) Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *The EMBO journal* 20:3333-41
- Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y (1987) Identification of three additional members of rat protein kinase C family: delta-, epsilon- and zeta-subspecies. *FEBS letters* 226:125-8
- Ortiz-Rivero S (2017) Role of C3G in the differentiation and maturation of megakaryocytes. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca
- Oury C, Toth-Zsomboki E, Vermeylen J, Hoylaerts MF (2002) P2X(1)-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen. *Blood* 100:2499-505
- Papadantonakis N, Makitalo M, McCrann DJ, Liu K, Nguyen HG, Martin G, Patel-Hett S, Italiano JE, Ravid K (2008) Direct visualization of the endomitotic cell cycle in living megakaryocytes: differential patterns in low and high ploidy cells. *Cell Cycle* 7:2352-6
- Papkoff J, Chen RH, Blenis J, Forsman J (1994) p42 mitogen-activated protein kinase and p90 ribosomal S6 kinase are selectively phosphorylated and activated during thrombin-induced platelet activation and aggregation. *Molecular and cellular biology* 14:463-72
- Pasvolosky R, Feigelson SW, Kilic SS, Simon AJ, Tal-Lapidot G, Grabovsky V, Crittenden JR, Amariglio N, Safran M, Graybiel AM, Rechavi G, Ben-Dor S, Etzioni A, Alon R (2007) A LAD-III syndrome is associated with defective expression of the Rap-1 activator CalDAG-GEFI in lymphocytes, neutrophils, and platelets. *The Journal of experimental medicine* 204:1571-82
- Pawlowski M, Ragab A, Rosa JP, Bryckaert M (2002) Selective dephosphorylation of the

- threonine(183) residue of ERK2 upon (alpha)IIb(beta)3 engagement in platelets. *FEBS letters* 521:145-51
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* 22:153-83
- Peraldi P, Zhao Z, Filloux C, Fischer EH, Van Obberghen E (1994) Protein-tyrosine-phosphatase 2C is phosphorylated and inhibited by 44-kDa mitogen-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:5002-6
- Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:10480-4
- Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, Tybulewicz VL, Watson SP (1997) The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *The EMBO journal* 16:2333-41
- Quinn MT, Parkos CA, Walker L, Orkin SH, Dinanier MC, Jesaitis AJ (1989) Association of a Ras-related protein with cytochrome b of human neutrophils. *Nature* 342:198-200
- Radha V, Rajanna A, Swarup G (2004) Phosphorylated guanine nucleotide exchange factor C3G, induced by pervanadate and Src family kinases localizes to the Golgi and subcortical actin cytoskeleton. *BMC cell biology* 5:31
- Radha V, Rajanna A, Gupta RK, Dayma K, Raman T (2008) The guanine nucleotide exchange factor, C3G regulates differentiation and survival of human neuroblastoma cells. *Journal of neurochemistry* 107:1424-35
- Radha V, Mitra A, Dayma K, Sasikumar K (2011) Signalling to actin: role of C3G, a multitasking guanine-nucleotide-exchange factor. *Bioscience reports* 31:231-44
- Raman M, Chen W, Cobb MH (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26:3100-12
- Ravid K, Beeler DL, Rabin MS, Ruley HE, Rosenberg RD (1991a) Selective targeting of gene products with the megakaryocyte platelet factor 4 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:1521-5
- Ravid K, Doi T, Beeler DL, Kuter DJ, Rosenberg RD (1991b) Transcriptional regulation of the rat platelet factor 4 gene: interaction between an enhancer/silencer domain and the GATA site. *Molecular and cellular biology* 11:6116-27
- Rebhun JF, Chen H, Quilliam LA (2000) Identification and characterization of a new family of guanine nucleotide exchange factors for the ras-related GTPase Ral. *The Journal of biological chemistry* 275:13406-10
- Relou IA, Hackeng CM, Akkerman JW, Malle E (2003) Low-density lipoprotein and its effect on human blood platelets. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60:961-71
- Ren J, Cook AA, Bergmeier W, Sondek J (2016) A negative-feedback loop regulating ERK1/2 activation and mediated by RasGPR2 phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications* 474:193-8
- Ren R, Ye ZS, Baltimore D (1994) Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites. *Genes & development* 8:783-95
- Rittenhouse-Simmons S (1979) Production of diglyceride from phosphatidylinositol in activated human platelets. *The Journal of clinical investigation* 63:580-7
- Rittenhouse SE, Sasson JP (1985) Mass changes in myoinositol trisphosphate in human platelets stimulated by thrombin. Inhibitory effects of phorbol ester. *The Journal of biological chemistry* 260:8657-60
- Roger S, Pawlowski M, Habib A, Jandrot-Perrus M, Rosa JP, Bryckaert M (2004) Costimulation of the Gi-coupled ADP receptor and the Gq-coupled TXA2 receptor

- is required for ERK2 activation in collagen-induced platelet aggregation. *FEBS letters* 556:227-35
- Rosado JA, Sage SO (2000) Protein kinase C activates non-capacitative calcium entry in human platelets. *The Journal of physiology* 529 Pt 1:159-69
- Rowley JW, Oler AJ, Tolley ND, Hunter BN, Low EN, Nix DA, Yost CC, Zimmerman GA, Weyrich AS (2011) Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood* 118:e101-11
- Rufanova VA, Lianos E, Alexanian A, Sorokina E, Sharma M, McGinty A, Sorokin A (2009) C3G overexpression in glomerular epithelial cells during anti-GBM-induced glomerulonephritis. *Kidney international* 75:31-40
- Rufanova VA, Alexanian A, Ostendorf T, Bokemeyer D, Prosser S, Miller B, Sorokin A (2010) Endothelin signaling via guanine exchange factor C3G in renal glomerular mesangial cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 88:808-16
- Saklatvala J, Rawlinson L, Waller RJ, Sarsfield S, Lee JC, Morton LF, Barnes MJ, Farndale RW (1996) Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue. *The Journal of biological chemistry* 271:6586-9
- Sakurai K, Matsuo Y, Sudo T, Takuwa Y, Kimura S, Kasuya Y (2004) Role of p38 mitogen-activated protein kinase in thrombus formation. *Journal of receptor and signal transduction research* 24:283-96
- Sayem ASM, Arya A, Karimian H, Krishnasamy N, Ashok Hasamnis A, Hossain CF (2018) Action of Phytochemicals on Insulin Signaling Pathways Accelerating Glucose Transporter (GLUT4) Protein Translocation. *Molecules* 23
- Schultess J, Danielewski O, Smolenski AP (2005) Rap1GAP2 is a new GTPase-activating protein of Rap1 expressed in human platelets. *Blood* 105:3185-92
- Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M (2001) Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochemical pharmacology* 62:1153-61
- Selbie LA, Schmitz-Peiffer C, Sheng Y, Biden TJ (1993) Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *The Journal of biological chemistry* 268:24296-302
- Shankar H, Garcia A, Prabhakar J, Kim S, Kunapuli SP (2006) P2Y12 receptor-mediated potentiation of thrombin-induced thromboxane A2 generation in platelets occurs through regulation of Erk1/2 activation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 4:638-47
- Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N (1998) Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 91:2645-57
- Shattil SJ, Newman PJ (2004) Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 104:1606-15
- Shin SY, Rath O, Choo SM, Fee F, McFerran B, Kolch W, Cho KH (2009) Positive- and negative-feedback regulations coordinate the dynamic behavior of the Ras-Raf-MEK-ERK signal transduction pathway. *Journal of cell science* 122:425-35
- Shivakrupa R, Radha V, Sudhakar C, Swarup G (2003) Physical and functional interaction between Hck tyrosine kinase and guanine nucleotide exchange factor C3G results in apoptosis, which is independent of C3G catalytic domain. *The Journal of biological chemistry* 278:52188-94
- Siess W, Siegel FL, Lapetina EG (1983) Arachidonic acid stimulates the formation of 1,2-diacylglycerol and phosphatidic acid in human platelets. Degree of phospholipase C activation correlates with protein phosphorylation, platelet shape change, serotonin release, and aggregation. *The Journal of biological chemistry* 258:11236-42
- Smolenski A (2012) Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 10:167-76
- Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, French PA, Dauerman HL, Becker RC (2009) Platelet functions beyond hemostasis. *Journal of*

- thrombosis and haemostasis : JTH* 7:1759-66
- Stefanini L, Roden RC, Bergmeier W (2009) CalDAG-GEFI is at the nexus of calcium-dependent platelet activation. *Blood* 114:2506-14
- Stefanini L, Bergmeier W (2010) CalDAG-GEFI and platelet activation. *Platelets* 21:239-43
- Stefanini L, Paul DS, Robledo RF, Chan ER, Getz TM, Campbell RA, Kechele DO, Casari C, Piatt R, Caron KM, Mackman N, Weyrich AS, Parrott MC, Boulaftali Y, Adams MD, Peters LL, Bergmeier W (2015) RASA3 is a critical inhibitor of RAP1-dependent platelet activation. *The Journal of clinical investigation* 125:1419-32
- Stefanini L, Bergmeier W (2016) RAP1-GTPase signaling and platelet function. *J Mol Med (Berl)* 94:13-9
- Stefanini L, Bergmeier W (2017) Negative regulators of platelet activation and adhesion. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*
- Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF (1985) A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *The Journal of cell biology* 101:880-6
- Stork PJ (2003) Does Rap1 deserve a bad Rap? *Trends in biochemical sciences* 28:267-75
- Stork PJ, Dillon TJ (2005) Multiple roles of Rap1 in hematopoietic cells: complementary versus antagonistic functions. *Blood* 106:2952-61
- Subramanian H, Zahedi RP, Sickmann A, Walter U, Gambaryan S (2013) Phosphorylation of CalDAG-GEFI by protein kinase A prevents Rap1b activation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 11:1574-82
- Sundaresan P, Farndale RW (2002) P38 mitogen-activated protein kinase dephosphorylation is regulated by protein phosphatase 2A in human platelets activated by collagen. *FEBS letters* 528:139-44
- Tanaka M, Clouston WM, Herr W (1994a) The Oct-2 glutamine-rich and proline-rich activation domains can synergize with each other or duplicates of themselves to activate transcription. *Molecular and cellular biology* 14:6046-55
- Tanaka S, Morishita T, Hashimoto Y, Hattori S, Nakamura S, Shibuya M, Matuoka K, Takenawa T, Kurata T, Nagashima K, et al. (1994b) C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:3443-7
- Tonks NK (2006) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 7:833-46
- Torti M, Lapetina EG (1994) Structure and function of rap proteins in human platelets. *Thrombosis and haemostasis* 71:533-43
- Uemura N, Griffin JD (1999) The adapter protein Crkl links Cbl to C3G after integrin ligation and enhances cell migration. *The Journal of biological chemistry* 274:37525-32
- Utreras E, Henriquez D, Contreras-Vallejos E, Olmos C, Di Genova A, Maass A, Kulkarni AB, Gonzalez-Billault C (2013) Cdk5 regulates Rap1 activity. *Neurochemistry international* 62:848-53
- Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B (2009) Calcium signaling in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7:1057-66
- Voss AK, Gruss P, Thomas T (2003) The guanine nucleotide exchange factor C3G is necessary for the formation of focal adhesions and vascular maturation. *Development* 130:355-67
- Voss AK, Krebs DL, Thomas T (2006) C3G regulates the size of the cerebral cortex neural precursor population. *The EMBO journal* 25:3652-63
- Voss AK, Britto JM, Dixon MP, Sheikh BN, Collin C, Tan SS, Thomas T (2008) C3G regulates cortical neuron migration, preplate splitting

- and radial glial cell attachment. *Development* 135:2139-49
- Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64:1057-68
- W**agner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Collier BS, Jordan RE (1996) Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 88:907-14
- Wang B, Mysliwiec T, Feller SM, Knudsen B, Hanafusa H, Kruh GD (1996) Proline-rich sequences mediate the interaction of the Arg protein tyrosine kinase with Crk. *Oncogene* 13:1379-85
- Wang SF, Aoki M, Nakashima Y, Shinozuka Y, Tanaka H, Taniwaki M, Hattori M, Minato N (2008) Development of Notch-dependent T-cell leukemia by deregulated Rap1 signaling. *Blood* 111:2878-86
- Warner TD (1996) Influence of endothelial mediators on the vascular smooth muscle and circulating platelets and blood cells. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology* 15:93-9
- Woulfe D, Jiang H, Mortensen R, Yang J, Brass LF (2002) Activation of Rap1B by G(i) family members in platelets. *The Journal of biological chemistry* 277:23382-90
- Wu HL, Gao X, Jiang ZD, Duan ZT, Wang SK, He BS, Zhang ZY, Xie HG (2013) Attenuated expression of the tight junction proteins is involved in clopidogrel-induced gastric injury through p38 MAPK activation. *Toxicology* 304:41-8
- Y**acoub D, Theoret JF, Villeneuve L, Abou-Saleh H, Mourad W, Allen BG, Merhi Y (2006) Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release. *The Journal of biological chemistry* 281:30024-35
- Yang J, Wu J, Jiang H, Mortensen R, Austin S, Manning DR, Woulfe D, Brass LF (2002) Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *The Journal of biological chemistry* 277:46035-42
- Yarwood S, Bouyoucef-Cherchalli D, Cullen PJ, Kupzig S (2006) The GAP1 family of GTPase-activating proteins: spatial and temporal regulators of small GTPase signalling. *Biochemical Society transactions* 34:846-50
- York RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW, Stork PJ (1998) Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392:622-6
- Z**arbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K (2007) Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood reviews* 21:99-111
- Zeiler M, Moser M, Mann M (2014) Copy number analysis of the murine platelet proteome spanning the complete abundance range. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 13:3435-45
- Zhang Y, Nagata Y, Yu G, Nguyen HG, Jones MR, Toselli P, Jackson CW, Tatsuka M, Todokoro K, Ravid K (2004) Aberrant quantity and localization of Aurora-B/AIM-1 and survivin during megakaryocyte polyploidization and the consequences of Aurora-B/AIM-1-deregulated expression. *Blood* 103:3717-26
- Zhou Q, Hellermann GR, Solomonson LP (1995) Nitric oxide release from resting human platelets. *Thrombosis research* 77:87-96

ANEXO



C3G transgenic mouse models with specific expression in platelets reveal a new role for C3G in platelet clotting through its GEF activity

Sara Gutiérrez-Herrero ^a, Vera Maia ^{a,1}, Javier Gutiérrez-Berzal ^{a,1}, Nuria Calzada ^a, María Sanz ^a, Consuelo González-Manchón ^{b,c}, Miguel Pericacho ^{b,c}, Sara Ortiz-Rivero ^a, José R. González-Porras ^{d,h}, María Arechederra ^{e,f}, Almudena Porras ^{e,f,*}, Carmen Guerrero ^{a,g,h,**}

^a Centro de Investigación del Cáncer, IBMCC, CSIC-Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

^b Departamento de Medicina Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain

^c CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain

^d Departamento de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

^e Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, UCM, Spain

^f Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

^g Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

^h IBSAL, Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 November 2011

Received in revised form 17 May 2012

Accepted 18 May 2012

Available online 29 May 2012

Keywords:

C3G

Platelet

Transgenic mice

Granulocyte

Neutrophil

Rap1

ABSTRACT

We have generated mouse transgenic lineages for C3G (tgC3G) and C3GΔCat (tgC3GΔCat, C3G mutant lacking the GEF domain), where the transgenes are expressed under the control of the megakaryocyte and platelet specific PF4 (platelet factor 4) gene promoter. Transgenic platelet activity has been analyzed through *in vivo* and *in vitro* approaches, including bleeding time, aggregation assays and flow cytometry. Both transgenes are expressed (RNA and protein) in purified platelets and megakaryocytes and do not modify the number of platelets in peripheral blood. Transgenic C3G animals showed bleeding times significantly shorter than control animals, while tgC3GΔCat mice presented a remarkable bleeding diathesis as compared to their control siblings. Accordingly, platelets from tgC3G mice showed stronger activation in response to platelet agonists such as thrombin, PMA, ADP or collagen than control platelets, while those from tgC3GΔCat animals had a lower response. In addition, we present data indicating that C3G is a mediator in the PKC pathway leading to Rap1 activation. Remarkably, a significant percentage of tgC3G mice presented a higher level of neutrophils than their control siblings. These results indicate that C3G plays an important role in platelet clotting through a mechanism involving its GEF activity and suggest that it might be also involved in neutrophil development.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Rap1 is a small GTPase of the Ras family that is ubiquitously expressed [1]. Many studies support a role for the Rap1 isoform Rap1b (but not Rap1a) in critical aspects of platelet function, including aggregation, coagulation, adhesion and spreading, through the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ [2,3]. Rap1b is highly expressed in mature megakaryocytes and platelets, accounting for about 0.1% of the

total cellular proteins [3]. Recently, genetic evidences have demonstrated that Rap1b is involved in a common crucial step required for platelet activation [4]. Rap1b participates in the responses triggered by most platelet agonists, including ADP, collagen, epinephrine, thrombin and PMA [4–6]. In particular, ADP, thrombin and PMA activate platelet Rap1b through pathways involving an increase in intracellular calcium via $\text{G}\alpha_q$ -mediated PLC activation [2]. Rap1b can also be activated by Ca^{2+} -independent mechanisms involving $\text{G}\alpha_i/\text{G}\alpha_z$ signaling and the subsequent activation of PI3K [7–9].

Rap proteins are activated upon binding to GTP, which is stimulated by guanine nucleotide exchange factors (GEFs) [3]. The RapGEFs described to have a significant expression in human platelets are CalDAG-GEFI/RasGRP2, CalDAG-GEFII/RasGRP3 and PDZ-GEF1 [10,11]. In mouse platelets, the most relevant Rap1 GEF described so far is CalDAG-GEFI, whose function is crucial for signal integration in platelets. Mouse platelets lacking CalDAG-GEFI are severely compromised in the integrin-dependent aggregation as a consequence of their

* Correspondence to: A. Porras, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, UCM, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain. Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain. Tel.: +34 913941627; fax: +34 913941779.

** Correspondence to: C. Guerrero, Centro de Investigación del Cáncer, Campus Unamuno s/n, 37007 Salamanca, Spain. Tel.: +34 923294817; fax: +34 923294795.

E-mail addresses: maporras@farm.ucm.es (A. Porras), cguerrero@usal.es (C. Guerrero).

¹ These authors contributed equally to the manuscript.

inability to activate Rap1 [12,13], although a CalDAG-GEF-independent Rap1 activation has been described in response to thrombin [5,14].

C3G is a Rap1/2 GEF that regulates Rap activation by tyrosine kinases [1,3]. C3G-mediated Rap1 activation plays critical roles in adhesion. In fact, C3G-dependent Rap1 activation is essential during early mouse embryogenesis due to its role in integrin- and paxillin-mediated cellular adhesion and spreading [15]. Moreover, C3G is required for the formation and stabilization of integrin β 1- and paxillin-positive focal adhesions [16]. C3G is also an essential activator of Rap1 during junction formation, both in epithelial and endothelial cells [17]. In addition, C3G has been implicated in Rap1-dependent adhesion in many hematopoietic-cell types [18,19]. Based on the critical role of C3G in adhesion processes regulated by Rap1, we can hypothesize that C3G, which is expressed at low level in mouse platelets [20], could participate in Rap1-mediated platelet functions. This is supported by previous data showing the involvement of C3G in thrombopoietin (TPO)-mediated Rap1 activation during megakaryocytic differentiation to platelets [3]. TPO binding to the Mpl receptor induces CrkL phosphorylation and the recruitment of a Cbl/CrkL/C3G complex, which results in the sustained activation of ERKs [21].

Rap1 is rapidly activated after stimulation of human platelets with α -thrombin. Phospholipase C-mediated increase in intracellular calcium is necessary and sufficient for this activation, which suggests the participation of CalDAG-GEFs [5,22]. Nevertheless, thrombin induces a second peak of Rap1 activation, which is mediated by protein kinase C (PKC), but independent of Ca^{2+} and CalDAG-GEF [5,14]. The specific components of this second pathway, and in particular, the specific GEF that contributes to the second wave of Rap1 activation has not been identified so far.

To examine whether C3G might play a role in platelet functions, we have generated C3G and C3G Δ Cat (C3G mutant with a deletion in the GEF domain) transgenic mice with specific protein over-expression in megakaryocytes and platelets. *In vivo* and *in vitro* experiments revealed a higher activation and aggregation of C3G transgenic platelets than those from wild type animals. In contrast, platelets expressing the C3G Δ Cat mutant showed impaired activation and aggregation. Thus, our results indicate that the manipulation of C3G expression modifies platelet responses and therefore, it could play an important role as a therapeutic target in thrombotic disorders through the modulation of Rap1 activity. Unexpectedly, C3G transgenic mice have a significant higher number of neutrophils than control mice, suggesting a possible C3G function in neutrophil development.

1.1. Research ethics

This study was carried out in strict accordance with the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm and Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Salamanca, ID number: SAF2010-20918-C02-02. All surgeries were performed under ketamine anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

2. Materials and methods

2.1. Genetic engineering of plasmids PF4-C3G-LN and PF4-C3G Δ Cat-LN

A BamHI fragment containing human C3G gene was excised from pLTR2C3G construct [23] and cloned into pBluescript SK+ (Stratagene) previously modified by *in vitro* mutagenesis to create a NcoI site (pBluescriptSK-NcoI), using oligonucleotides pSKNcoI-F (5'-TGATATCAAGCTTATCGATACCATGGACCTCGAGG-3') and pSKNcoI-R (5'-CCTCGAGGTCCATGGTATCGATAAGCTTGATATCGA-3'). The resulting construct was named pSKNco-C3G. PF4-Globin vector, containing the 1.1 kb rat PF4 promoter followed by a 1.7 kb fragment of the human

β -globin gene [24,25], was modified by cloning a SpeI linker (NEB, Ipswich, MA) into the restriction site BsgI. The fragment containing β -globin gene was removed by NcoI-SpeI digestion and substituted by the C3G fragment excised from pSKNco-C3G to generate plasmid PF4-C3G.

The DNA fragment containing mutant C3G Δ Cat was obtained from plasmid pLTR2C3G Δ Cat [23] by digestion with BamHI and ClaI and inserted into plasmid pSP72 (Promega). Then, the C3G Δ Cat fragment was removed from this construct with HindIII and BglII and cloned into pBluescriptSK-NcoI to create pSKNcoI-C3G Δ Cat. C3G Δ Cat was finally excised from this construct with NcoI-SpeI and cloned into PF4-Globin containing the SpeI linker. The resulting construct was named PF4-C3G Δ Cat.

A 1765 bp HindIII-EcoICRI LoxP flanked, Eukaryotic Neomycin Selection Cassette (LoxP-PGK-Neo-LoxP) (supplied by GenOway, Lyon, France) was inserted into HindIII-SmaI sites of pSP72. From this construct, the LoxP-PGK-Neo-LoxP cassette was excised as a KpnI-XhoI fragment and inserted into the unique KpnI-XhoI restriction sites of PF4-C3G and PF4-C3G Δ Cat to generate final plasmids PF4-C3G-LN and PF4-C3G Δ Cat-LN (Figs. S1, 1B). The PF4-C3G-LN and PF4-C3G Δ Cat-LN constructs were linearized by digestion with PvuII/KpnI. In this process, a 1.5 kb fragment containing the bacterial ampicillin resistance gene was eliminated. The respective 8.2 kb and 7.8 kb resulting fragments were purified by electroelution followed by ethanol precipitation and used for ES cell electroporation. GenOway performed the generation of chimeras by blastocyst injections of stable ESC clones using GenOways's Safe DNA transgenesis technology™.

2.2. Genotyping of transgenic mice by PCR

Genomic DNA was purified from lysed tails by precipitation with 5 M NaCl and ethanol (protocol based on [26]). Then, for Southern blot analysis it was digested with BamHI to obtain a fragment of 3.6 kb or 5.3 kb from C3G or C3G Δ Cat constructs respectively, which were detected using a radioactively labeled 740 bp EcoRI probe, produced by digestion of PF4-C3G-LN construct (Fig. 1B, C). In addition, genomic DNA amplification was performed by polymerase chain reaction (PCR) using the following primers: A1 (sense): 5'-ACCACATGGCAGTCAAACCTCACAGC-3' and C1 (antisense): 5'-TCTTCTGCCITTTGAGACCTGGAAGC-3' to get a fragment of 847 bp (Fig. 1A, B and D). Primer A1 aligns within the PF4 promoter fragment, whereas primer C1 aligns within the second exon of C3G gene. PCR conditions were: 94 °C, 45 s; 57 °C, 45 s; 72 °C, 80 s; 40 cycles.

2.3. Platelet purification for RNA analysis

Blood (0.5–1 ml) was collected by retro-orbital bleeds from anesthetized mice (156 mg/kg ketamine, 6 mg/kg valium and 150 μ g/kg atropine in 0.9% NaCl) and used to prepare platelet-rich plasma (PRP) upon treatment with 200–400 μ l of acid citrate-dextrose (ACD) anticoagulant solution (80 mM trisodium citrate, 52 mM citric acid, 180 mM glucose). The PRP was isolated by spinning the anti-coagulated blood at 200 g, 20 min at RT. This PRP was centrifuged at 3160 g for 10 min to obtain the platelet pellet. Remaining red cells were eliminated by a brief incubation of the pellet with 1% ammonium oxalate. After two additional washes in PBS, the platelet pellet was resuspended in RLT lysis buffer from RNeasy kit (QIAGEN) following the manufacturer specifications for total RNA extraction.

2.4. Semiquantitative RT-PCR

cDNA from transgenic and control platelets was obtained from RNA using SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) and amplified by PCR to determine C3G expression using specific primers corresponding to different human C3G exons: Ex3 Forward (F): 5'-

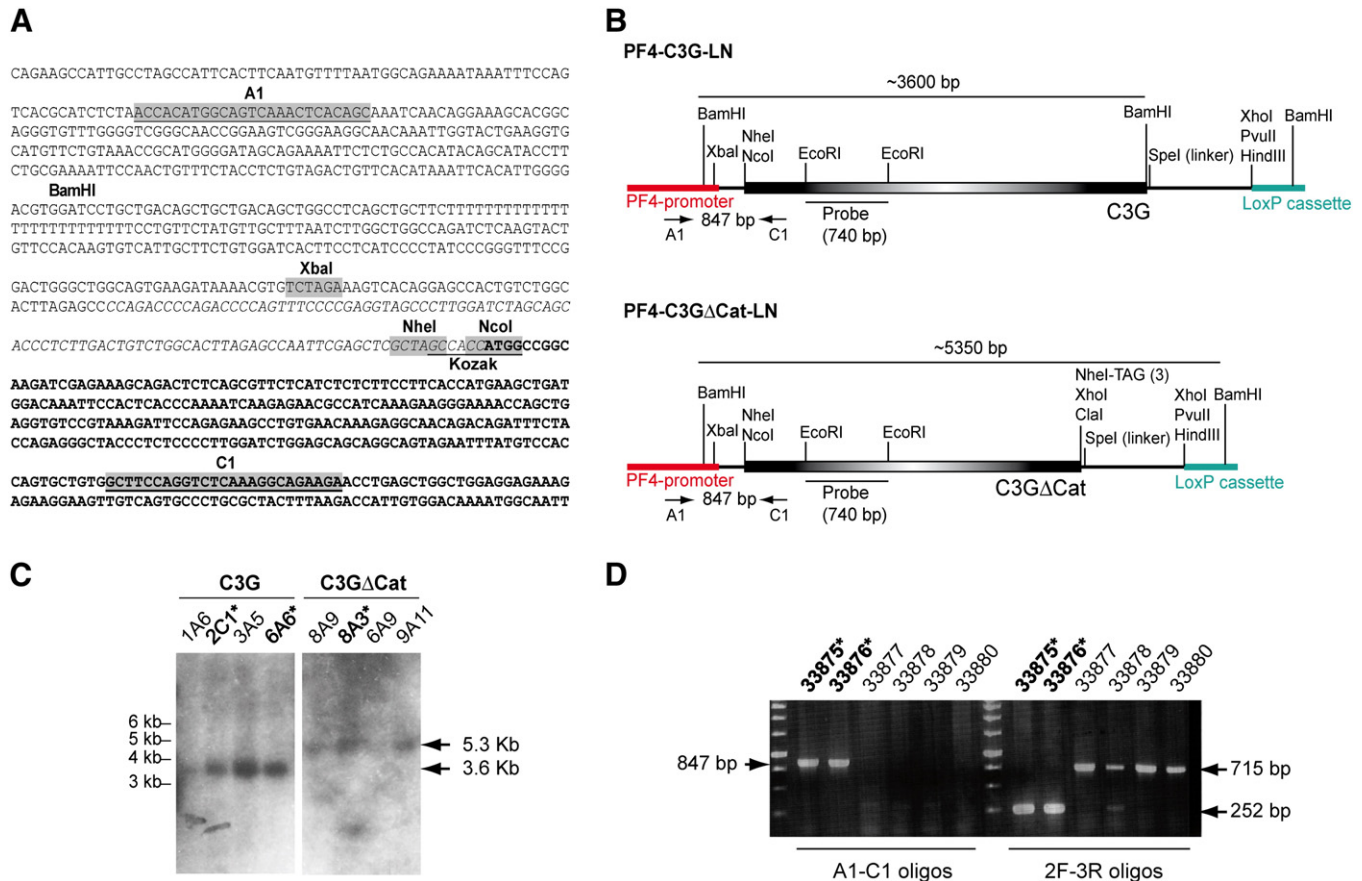


Fig. 1. Genomic analysis of PF4-C3G-LN and PF4-C3GΔCat-LN constructs. (A) Partial sequence of PF4 promoter and C3G gene (bold), common to both PF4-C3G-LN and PF4-C3GΔCat-LN constructs. Primers A1 and C1, used in mice genotyping, are shadowed and underlined. BamHI, XbaI, NheI and NcoI restriction sites are shadowed. Nucleotides in italic correspond to an intronic sequence present in the constructs. Consensus Kozak sequence is underlined. (B) Schematic representation of the linearized PF4-C3G-LN and PF4-C3GΔCat-LN constructs showing relevant restriction enzymes, the position of A1 and C1 primers and the location of the 740 bp EcoRI probe used in the Southern blot analysis. The size of the BamHI fragments detected by the probe is indicated. (C) Screening of transgenic clones by Southern blot with genomic DNA (20 μg) extracted from the indicated C3G and C3GΔCat clones. The arrows point to the position of the 3.6 kb and 5.3 kb bands detected with the radiolabeled EcoRI probe. Clones selected for this work are marked with an asterisk. (D) Screening of C3G-6A6 positive clones by PCR analysis of genomic DNA extracted from the indicated clones. Oligonucleotides A1/C1 detected a band of 847 bp in the transgenic clones, while oligonucleotide pair 2F/3R amplified a 252 bp band, corresponding to exons 2–3 of the human transgene. In addition, oligonucleotides 2F/3R amplified a 715 bp band in the controls, corresponding to mouse genomic DNA, which includes intron 2. Positive clones are highlighted with an asterisk.

GCAACAGACAGATTCTACCAG-3'; Ex4 Reverse (R): 5'-CTGTGCTGA-ATTCGAGGATC-3'; Ex5R: 5'-CTTCACTCCATCCAGCACA-3'; Ex7F: 5'-AGCAGAGTCTCCCCTGA-3'; Ex8F: 5'-CTCCACCAGCATTGACAC-3'; Ex9R: 5'-CTAGTGTTCACAGCTTGTGT-3'; Ex10F: 5'-ACCACTATGATCCCGACT-ATG-3'; Ex12R: 5'-TCACTGCGCTCTCTGCTG-3'; Ex15F: 5'-GATTGGTG-TTGACTGCGAG-3'; Ex17R: 5'-CCTGCTGCTACCC-3'; Ex22F: 5'-GGCCTGGCCGAGTACT-3'; Ex24R: 5'-TGCTGGAAGCAGCGCATG-3'. The amplified fragments were normalized against the mouse gene CD41, a platelet specific internal control, using primers: mCD41-F1: 5'-ATGC-GGGCTCTCAGCAACATTG-3' and mCD41-R1: 5'-TTGCCACAGGCAACAT-CACGAC-3'. The conditions for PCR were: 94 °C, 45 s; 55 °C, 45 s; and 72 °C, 80 min for 35 cycles. Densitometric analysis of the bands was performed using Image J (Image Processing and Analysis in Java) free software.

2.5. Megakaryocytic differentiation

Freshly isolated bone marrow cells from femurs of 6–8 week-old mice were cultured in RPMI supplemented with 20% horse serum and maintained at 5% CO₂ and 33 °C. Megakaryocytes were differentiated from bone marrow cultures by addition of 50 ng/ml thrombopoietin (TPO, CellGenix) to promote megakaryopoiesis. After 7 days, cells in suspension were collected and used to prepare protein extracts or total RNA as described above.

2.6. Bleeding time

Measurements were made in 3 week-old mice at weaning (before genotyping) and in the same mice at 6-month age. A 5 mm section of the tail tip from anesthetized mice was transected, and the tail was immersed in 37 °C PBS to score time to cessation of blood flow.

2.7. Flow cytometric analysis of C3G expression and platelet activation

Platelet activation was determined by flow cytometry using FITC Rat anti-mouse CD62P antibody (BD Pharmingen) to detect P-selectin expression on the surface and Alexa Fluor® 488 labeled fibrinogen (Molecular Probes), which selectively binds to the high affinity conformation of the αIIbβ3 integrin. Alternatively, we measured integrin activation using PE-labeled Rat anti-mouse αIIbβ3 (JON/A clone) antibody (Emfret Analytics) [27]. Blood (50 μl) was collected from the retro-orbital plexus of anesthetized mice with a heparinized glass capillary into 2 ml tubes containing 200 μl of TBS/heparin (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, pH 7.3, 20 U/ml heparin). Heparinized blood was diluted 1:6 with modified Tyrode's Hepes buffer (134 mM NaCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 2.9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 20 mM Hepes [N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid], pH 7.0) containing 5 mM glucose, 0.35% bovine serum albumin (BSA), and 1 mM CaCl₂. Diluted blood was washed by spinning 5 min at 1300 g and suspended in the same buffer. Finally,

blood samples (25 μ l out of 1.25 ml) were incubated with the agonists together with appropriate fluorophore-conjugated monoclonal antibodies or fibrinogen for 15 min at room temperature and directly analyzed on a FACSCalibur (Becton Dickinson). PMA (2 μ M), α -thrombin (0.2 U/ml or 1 U/ml) and ADP (10 μ M) were used as agonists of platelet activation [28]. For analysis of C3G expression Tyrode's Hepes buffer-washed blood, prepared as above, was incubated with saturating amounts of FITC-labeled CD41 for 20 min in the dark. After two washes in PBS/1% BSA/0.1% Na-azide, blood was fixed in 200 μ l of Leucoperm™ Reagent A (AbD Serotec) at room temperature for 15 min. After washing with PBS/1% BSA, fixed blood was permeabilized and stained for C3G by incubation with Leucoperm™ Reagent B (AbD Serotec) and rabbit anti-C3G antiserum #1008 [23,29] for 30 min at RT. After washing twice with PBS/1% BSA, platelets were incubated with saturating amounts of anti-rabbit-Cy5 for 20 min in the dark, washed again twice and resuspended in 400 μ l PBS before flow cytometric analysis. FlowJo 9.1 (Tree Star, Inc. Ashland, OR) software program was used for data analysis.

2.8. Platelet aggregation assays

Platelet aggregation was measured in a final volume of 800 μ l of blood diluted to 1:2 with HEPES buffer, using a Chrono-Log aggregometer (Haverton, USA). Samples were incubated at 37 °C under constant stirring and, after 5 min, 5 μ g/ml collagen (Chrono-Log) was added. The extent of platelet aggregation was defined arbitrarily as the percent of increase of electrical resistance between the two immersed wires of the electrode probe. For ADP-, PAR-4 receptor-specific agonist, GYPGKF (PAR4) and PMA-induced platelet aggregation, a Multiplate Aggregometer (Verum Diagnostica GmbH) was used. Citrated blood (175 μ l) was diluted 1:2 in 0.9% saline solution, containing 62.5 mM CaCl₂, and incubated at 37 °C under constant stirring. After 3 min, 6.6 μ M ADP, 10 μ M PMA, 1 μ M PMA or 0.66 mM PAR4 was added and aggregometry was monitored for 6 min. The extent of platelet aggregation was measured as the increase in impedance generated by the attachment of platelets onto the Multiplate sensor, which is transformed into arbitrary aggregation units.

2.9. Rap1 activation assay

Activation of Rap1 was evaluated essentially as described previously [30] using GST-RalGDS RBD immobilized on Glutathione-Sepharose, which is known to bind specifically and selectively the GTP-bound form of Rap1B. Briefly, same volume of PRP per assay, containing about 5–10 $\times 10^7$ mouse platelets, were stimulated at room temperature with 0.2 U/ml α -thrombin for 1 min or 0.2 μ M PMA for 5 min. When indicated, platelets were pretreated with 5 μ M bisindolylmaleimide, 1 min before PMA stimulation. Platelets were then lysed for 10 min at 4 °C with equal volume of 2 \times RIPA modified lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 400 mM NaCl, 2% NP-40, 5 mM MgCl₂, 2% glycerol, 2 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 2 mM PMSF, 2 μ M aprotinin, 2 μ M leupeptin). Glutathione-agarose beads prebound to RalGDS RBD fused to GST were washed with ice-cold lysis buffer and 20 μ l bead volume was added to cell lysates and incubated for 45 min at 4 °C. The precipitates were collected by brief centrifugation, washed three times with 1 \times RIPA buffer, and finally resuspended in 25 μ l of SDS sample buffer. Precipitated GTP-Rap1 was separated by SDS-PAGE and detected by immunoblotting with anti-Rap1mAb (610196) from BD Biosciences. Total Rap1 present in platelet lysates was determined in a 20 μ l of lysate sample, removed prior to bead addition, by Western-blot analysis of Rap1. Fold stimulation of active Rap1 was determined by densitometry using Image J free software.

2.10. Flow cytometric analysis of neutrophil content

The percentage of neutrophils in whole blood was determined by flow cytometry using antibodies against the granulocyte specific markers Ly-6G/6C (Gr1) and CD11b (Mac1) (BD Pharmingen). Briefly, EDTA-anticoagulated blood (100–150 μ l) was incubated for 30 min with 12 ml ice-cooled red blood cells lysis buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 10 mM EDTA pH 7.4) to eliminate the erythrocytes. After a 10 min centrifugation, blood cells were washed with cold PBS containing 1% fetal calf serum (FCS). Cells were resuspended in 150–200 μ l PBS/1% FCS and incubated with excess of antibodies for 20 min at 4 °C in the dark.

2.11. Evaluation of blood cellularity

White blood cells and platelet counting was determined from EDTA-anticoagulated blood (30 μ l) using a hemocytometer (Hemavet Counter HV950FS).

2.12. Statistical analysis

Data are represented as mean \pm SEM. As comparisons were made between two experimental groups, an unpaired Student's *t*-test was used. Results were considered significant when *p* < 0.05.

3. Results

3.1. Generation of transgenic mouse models expressing C3G or mutant C3G Δ Cat under the PF4 gene promoter

C3G and C3G Δ Cat mutant (lacking the last 439 bp of full-length C3G catalytic domain) [23] were cloned into plasmid PF4-Globin to specifically direct transgene expression to megakaryocytes and platelets [24,25,31]. To do so, the fragment carrying the β -globin gene was replaced by C3G- or C3G Δ Cat-fragments. A LoxP-PGK-Neo-LoxP cassette was also inserted in both constructs. The resulting plasmids were named PF4-C3G-LN and PF4-C3G Δ Cat-LN, respectively (Fig. S1), where the transgenes were under the control of the PF4 gene promoter (Fig. 1A, B). The constructs also contain a Kozak consensus sequence to ensure a correct initiation of translation (Fig. 1A). Both constructs were used to generate transgenic mice through blastocyst injection of stable ESCs (performed by GenOway Company, Lyon, France). We selected two C3G transgenic lines (2C1 and 6A6) and one C3G Δ Cat line (8A3), with correct integration of the transgenes (Fig. 1C, D).

3.2. Characterization of C3G transgene expression

Semiquantitative RT-PCR analysis of total RNA from purified platelets, using primers for different C3G exons, revealed a significant C3G over-expression in transgenic platelets as compared to those from wild type mice (Fig. 2A). Platelets from heterozygous animals also showed a clear increase in C3G expression (Fig. 2A). An evident C3G over-expression (~2–4 fold increase) was also detected in platelets from C3G Δ Cat transgenic animals. As expected, we did not observe any increase in the expression of exons 22–24 in C3G Δ Cat mutant, as this region was deleted (Fig. 2B). Platelet specific CD41 gene (GPIIb, encoding the α IIb subunit of platelet integrin α IIb β 3) was amplified as a control of platelet integrity and loading. C3G over-expression was also observed in TPO-differentiated megakaryocytes from the transgenic C3G-2C1 line (Fig. 2C), but no C3G over-expression was detected in other tissues such as liver or kidney (Fig. S2), in agreement with the restricted expression of the transgenes to megakaryocytes and platelets [24].

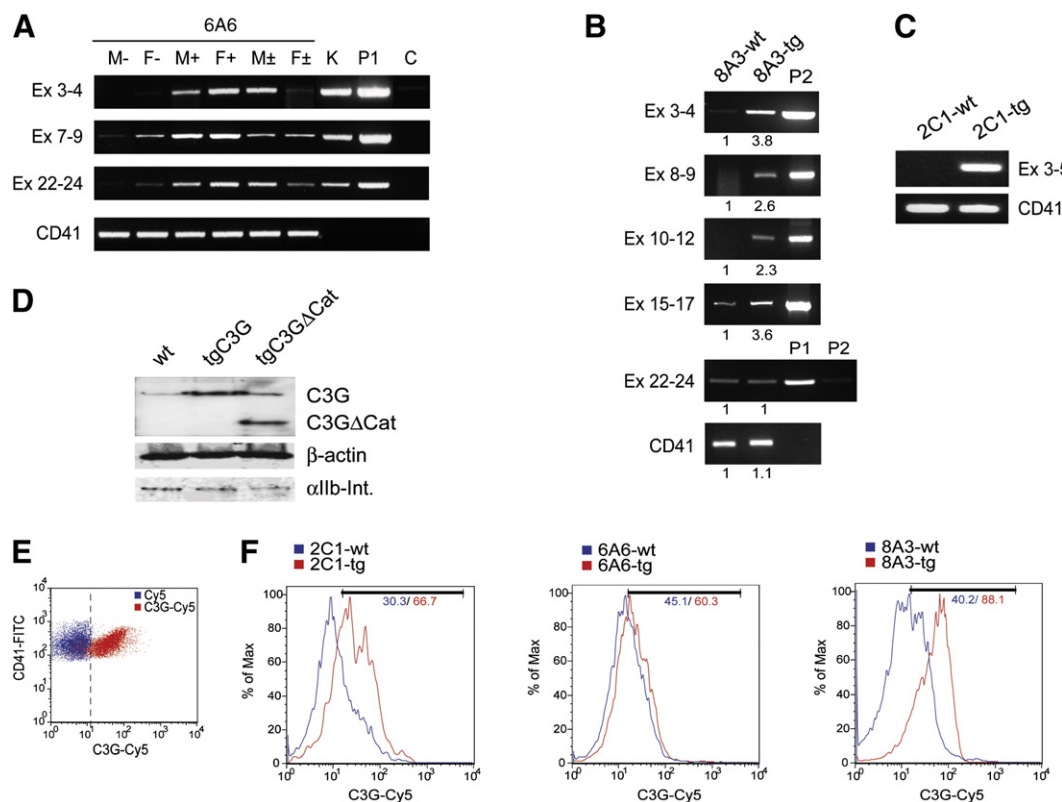


Fig. 2. Expression of C3G transgenes. C3G expression was analyzed by RT-PCR in purified platelets from (A) wild type (–), homozygous (+) or heterozygous (±) full-length C3G (6A6 line) or (B) C3GΔCat transgenic mice (8A3 line) and their corresponding wild type siblings. Each panel shows the expression of the indicated C3G exons, which were amplified with forward and reverse oligonucleotides located in the first and last exons respectively. K: cDNA from K562 cells, P1: pLTR2C3G plasmid, P2: PF4-C3GΔCat-LN plasmid, C: PCR mix without cDNA, M: male, F: female. Relative densitometric values are shown. wt: wild type, tg: transgenic. (C) TPO-differentiated bone marrow cells RNA, from a C3G-2C1 transgenic mouse and a wild type sibling, was isolated and reverse transcribed to generate cDNA. PCR was subsequently conducted using primer sets that specifically amplify exons 3 to 5. Expression of CD41 was determined as loading control in panels A to C. (D) TPO-differentiated bone marrow total cell lysates were obtained from wild type, transgenic C3G-2C1 and transgenic C3GΔCat-8A3 mice. The panel is a representative Western blot showing transgenic C3G and C3GΔCat protein expression, together with the endogenous C3G, detected with anti-C3G (H-300) antibody (Santa Cruz Biotechnologies, sc-15359) and normalized with anti-β-actin antibodies (Sigma, A5441) and anti-Integrin αIIb (B-10) antibodies (Santa Cruz Biotechnologies, sc-166599). (E) Specificity of the intracellular C3G detection in platelets by flow cytometry; the plot represents a double labeling, CD41-FITC/anti-rabbit-Cy5, of peripheral blood cells incubated with or without rabbit anti-serum C3G #1008. (F) Representative histograms showing double CD41-FITC/C3G-Cy5-labeled blood cells from a transgenic 2C1 (left panel), 6A6 (middle panel) or 8A3 (right panel) mouse and their corresponding sibling controls. The percentage of C3G expression in the platelets gated by SSC/CD41-FITC is shown. Graphs are representative of 5 independent experiments. wt: wild type, tg: transgenic.

Expression of C3G and C3GΔCat transgenic proteins was evident in lysates of TPO-differentiated megakaryocytes, as compared to wild type mice (Fig. 2D). Transgene expression was also detected in platelets by flow cytometry (cells positive for CD41 and C3G-Cy5), although expression levels showed great variability among individuals (Fig. 2E, F).

3.3. C3G and C3GΔCat transgenes alter the hemostatic function of platelets

To study the involvement of C3G on hemostasis, we performed tail-bleed assays in transgenic mice and their wild type siblings at weaning and 6 months later in the same animals. At weaning, tgC3G animals showed statistically significant shorter bleeding times than control animals (mean ± SEM: 44.0 ± 4.5 s vs 64.2 ± 6.7 s, respectively, $p = 0.024$). In contrast, the mean time for bleeding cessation in tgC3GΔCat animals was significantly higher than in their corresponding sibling controls (125.8 ± 17.7 s vs 86.8 ± 7.5 s, respectively, $p = 0.0052$, Fig. 3A). The differences were reinforced after 6 months, especially for tgC3GΔCat mice (74.1 ± 11.0 s in tgC3G vs 122.1 ± 17.3 s in wild type; $p = 0.0275$ and 254.1 ± 24.8 s in tgC3GΔCat vs 89.3 ± 10.2 s in wild type; $p = 0.000085$, Fig. 3B). The same tendency was observed in the blood mass obtained (data not shown). The hemostatic disorder observed in the transgenic animals was not due to defects in platelet formation, as the platelet number was similar in mice of the different

genotypes (Table 1). Additionally, there were no significant changes in hematocrit and hemoglobin levels in transgenic animals (Table S1), which means that C3GΔCat transgenic animals do not suffer from spontaneous hemorrhaging or anemia. These results indicate that C3G participates in platelet clotting through a mechanism dependent on its catalytic domain, which might involve the participation of Rap1 in this effect.

3.4. C3G and C3GΔCat transgenes modify the response of platelets to agonists

To determine whether the hemostatic defects observed in the transgenic animals were caused by impaired platelet function, we induced platelet activation by using several agonists known to activate Rap1, including thrombin, PMA and ADP. We determined P-selectin expression on the surface, as a measure of agonist-induced degranulation, and integrin αIIbβ3 activation, as a measure of inside-out signaling. As shown in Fig. 4A, platelets from transgenic C3G mice showed higher expression of P-selectin on the surface in response to thrombin and PMA, while a significant reduced response to these agonists was observed in platelets from C3GΔCat transgenic animals as compared to wild type platelets. Similarly, platelets from C3G transgenic mice showed higher αIIbβ3 binding to Alexa Fluor® 488-conjugated fibrinogen in response to thrombin and ADP, while integrin from C3GΔCat-expressing platelets was less responsive to

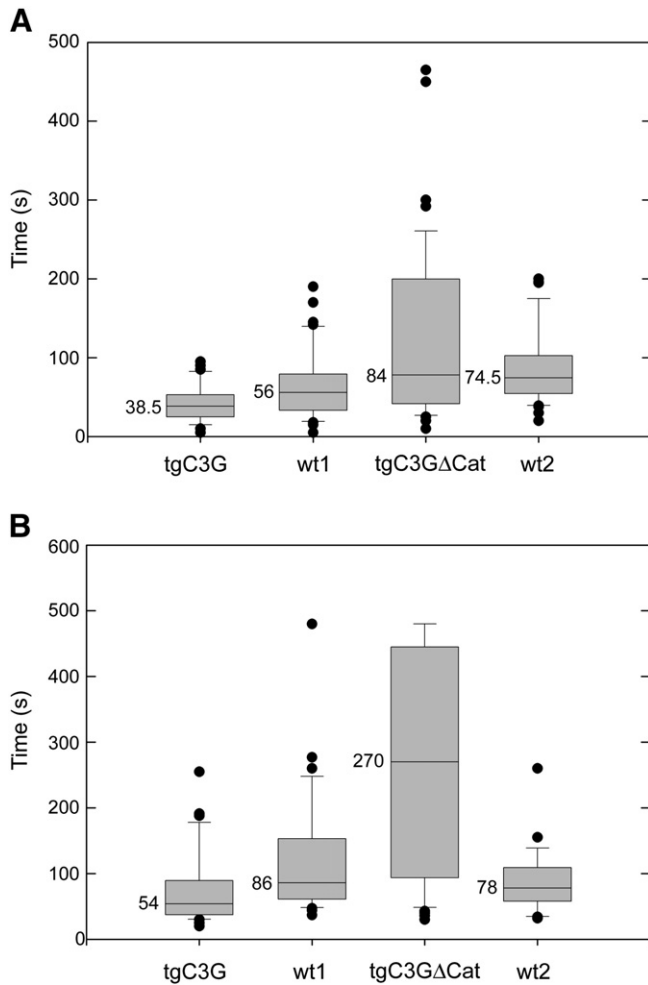


Fig. 3. Transgenic mice showed altered hemostasis. (A) Tail-bleed assays performed on transgenic C3G (tgC3G) and transgenic C3GΔCat (tgC3GΔCat) mice and their wild type controls (wt1 and wt2 respectively) at weaning. (B) The experiment was repeated in the same animals after 6 months. The box plots represent the bleeding times of 30–40 animals of each genotype. The median values are shown.

these agonists than control platelets (Fig. 4B). Similar results were obtained with the JON/A antibody regarding thrombin activation (data not shown). Expression of α IIb β 3 was similar in transgenic and control platelets, as assessed by flow cytometry with anti-CD41-APC (data not shown). Under our experimental conditions, PMA barely stimulated α IIb β 3 integrin, while ADP hardly affected surface P-selectin levels, as previously observed by other authors [28]. Additionally, platelet aggregation was impaired in tgC3GΔCat platelets in response to 5 μ g/ml collagen. In contrast, tgC3G platelets showed increased aggregation as compared with platelets from wild-type mice (Fig. 4C, D). Similar results were obtained in response to ADP, PMA and PAR4 peptide (Fig. 4E and Fig. S3). All these *in vitro* experiments are in agreement with the tail-bleed assay and suggest that C3G participates in PMA, thrombin, ADP and collagen-mediated platelet activation, possibly through Rap1. Moreover, fibrinogen-binding and aggregation assays indicate that C3G plays a role in the inside-out activation of α IIb β 3 integrin.

3.5. Activation of Rap1 in the transgenic platelets: Rap1 mediates the effect of C3G

All the above results indicate that C3G overexpression enhances Rap1-mediated integrin activation. In contrast, C3GΔCat transgene would behave as a C3G dominant negative mutant, inhibiting Rap1. To confirm this hypothesis, we performed a Rap1 activation assay

Table 1
C3G transgenes do not modify platelet number.

Genotype	Sex	NA	Plt ($\times 10^3/\mu$ l) mean \pm SEM
2C1 +	M	25	1145 \pm 101
	F	21	1059 \pm 59
2C1 –	M	11	961 \pm 32
	F	12	1020 \pm 51
6A6 +	M	31	1038 \pm 31
	F	37	996 \pm 35
6A6 –	M	33	1120 \pm 48
	F	29	974 \pm 35
8A3 +	M	20	1194 \pm 49
	F	24	1063 \pm 51
8A3 –	M	13	1191 \pm 68
	F	14	1000 \pm 56

Platelet counts in transgenic mice and wild type siblings of the different genotypes. Counts were performed using a Hemavet Counter HV950FS. *p* Values for transgenic animals versus wild type siblings are as follows: 0.12 for 2C1 males, 0.33 for 2C1 females, 0.08 for 6A6 males, 0.34 for 6A6 females, 0.48 for 8A3 males, 0.27 for 8A3 females. NA: number of animals. Plt: platelets.

on freshly isolated PRP stimulated with 0.2 U/ml α -thrombin for 1 min, conditions that have been widely validated [5,12]. Basal Rap1 activation was increased in tgC3G mice as compared to that in wild type siblings, while tgC3GΔCat platelets showed lower Rap1-GTP basal levels than control animals (Fig. 5A). Similarly, Rap1 activation by thrombin was stronger in tgC3G platelets than in wild type platelets, while thrombin-stimulated tgC3GΔCat platelets showed lower Rap1-GTP levels than wild type siblings, in agreement with data in Fig. 4.

It has been described that, under aggregating conditions, thrombin-induced Rap1 activation is rapidly downregulated [5]. When the experiment was performed under these conditions (platelets stirred during incubation), we observed a faster Rap1 downregulation in tgC3G platelets and a significant lower downregulation in tgC3GΔCat platelets as compared to their respective controls (Fig. 5B). All these results indicate that transgenic C3G and C3GΔCat expression upregulates or down-regulates Rap1 activation, respectively, which is in agreement with their effects in platelet aggregation.

3.6. C3G is a relevant mediator in the PKC pathway leading to Rap1 activation

Platelet aggregation stimulated by PMA was not affected in CalDAG-GEF1 KO platelets [12], which suggests the existence of other Rap1 GEFs playing a role in PKC-mediated Rap1 activation. To assess whether C3G could contribute to the PKC-Rap1 pathway in platelets, we performed a Rap1 assay on PRP stimulated with 0.2 μ M PMA for 5 min in the presence or absence of the PKC inhibitor bisindolylmaleimide. Results in Fig. 6A show that, PMA stimulates Rap1, in agreement with previous reports [5]. This stimulation was much higher in C3G transgenic platelets than that in wild type platelets, which is in agreement with the results shown in Fig. 4 and suggests that C3G participates in the platelet PKC pathway. Furthermore, the increase in PMA-induced Rap1 activation observed in C3G transgenic platelets was almost completely abolished by bisindolylmaleimide, which indicates that PKC-induced Rap1 activation is mediated by C3G. This was confirmed by the absence of Rap1 activation in response to PMA in tgC3GΔCat platelets. These results are supported by platelet activation assays monitoring P-selectin expression on the surface. Fig. 6B shows that the increase in P-selectin expression observed in C3G transgenic platelets stimulated with PMA was prevented upon pre-treatment with bisindolylmaleimide. In contrast, platelet activation by thrombin was only partially inhibited by bisindolylmaleimide (Fig. 6B), in agreement with the existence of thrombin-induced PKC-dependent and independent pathways [5]. Therefore, we have

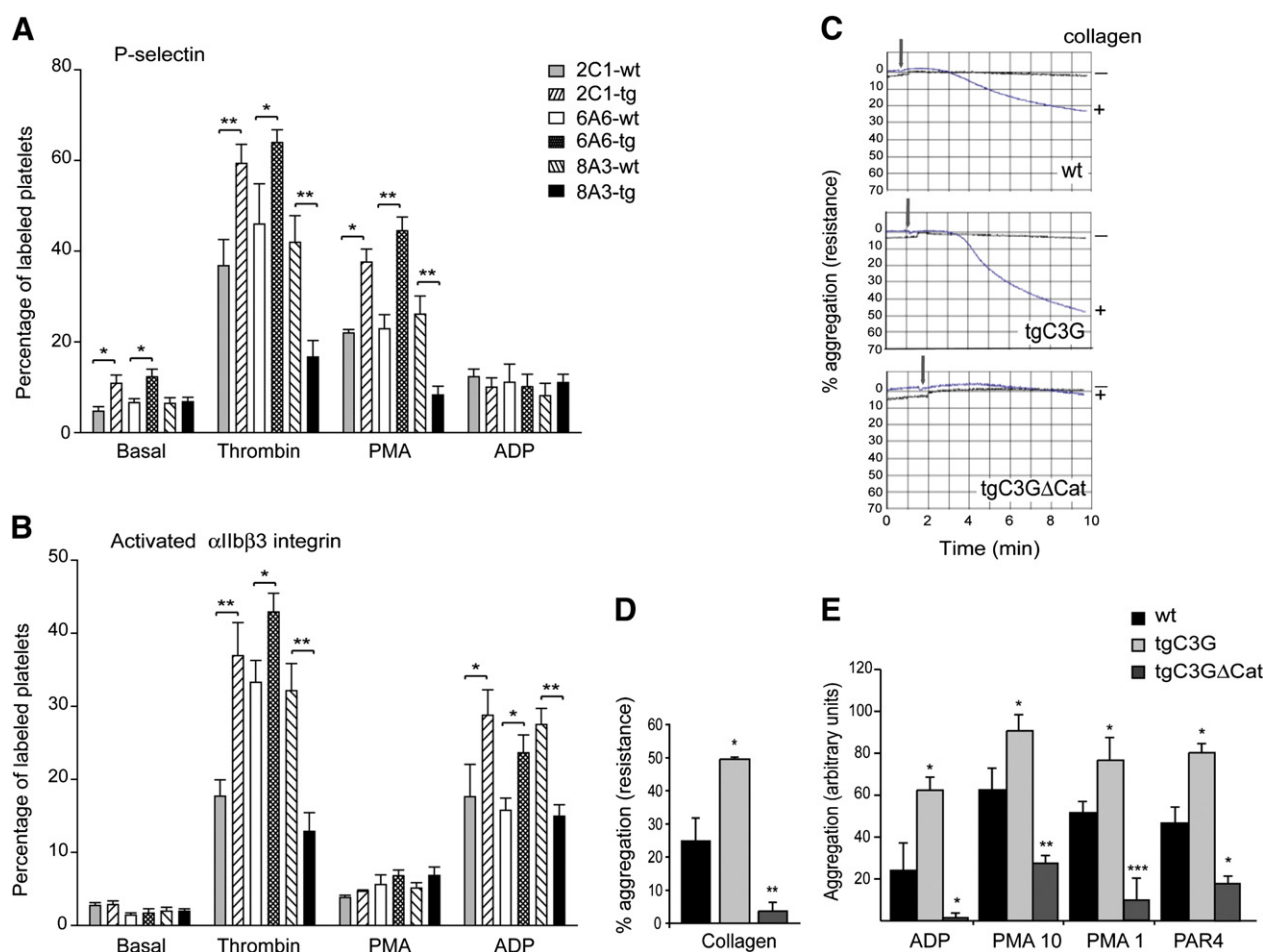


Fig. 4. Transgenic platelets are differently activated in response to agonists. Washed blood from transgenic and wild type mice was stimulated with PMA (2 μM), α -thrombin (0.2 U/ml) or ADP (10 μM) and incubated with (A) anti-CD62P-FITC antibody to determine the percentage of platelets expressing P-selectin on the surface or (B) with Alexa Fluor® 488-conjugated fibrinogen to determine the percentage of platelets with activated $\alpha\text{IIb}\beta 3$ integrin. The histograms represent the mean \pm SEM of 10 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; values are relative to the corresponding control platelets for each genotype. wt: wild type, tg: transgenic. (C) Representative aggregation traces from wild type, tgC3G and tgC3G Δ Cat mouse platelets treated with collagen (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Arrows indicate the addition of agonist. (—) Lines: non-stimulated platelets, (+) lines: collagen-stimulated platelets. (D) Histograms represent the mean \pm SEM of the aggregation percentage (as a measure of electrical resistance) of collagen-treated platelets from 3 mice of each genotype. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs wild type. Values for wild type animals include one animal per line (2C1, 6A6 and 8A3). (E) Histograms represent the mean \pm SEM of the aggregation values (relative units) of ADP (6.6 μM), PMA (10 μM and 1 μM) and PAR4 (0.66 mM)-treated platelets from 3 to 5 mice of each genotype. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs wild type.

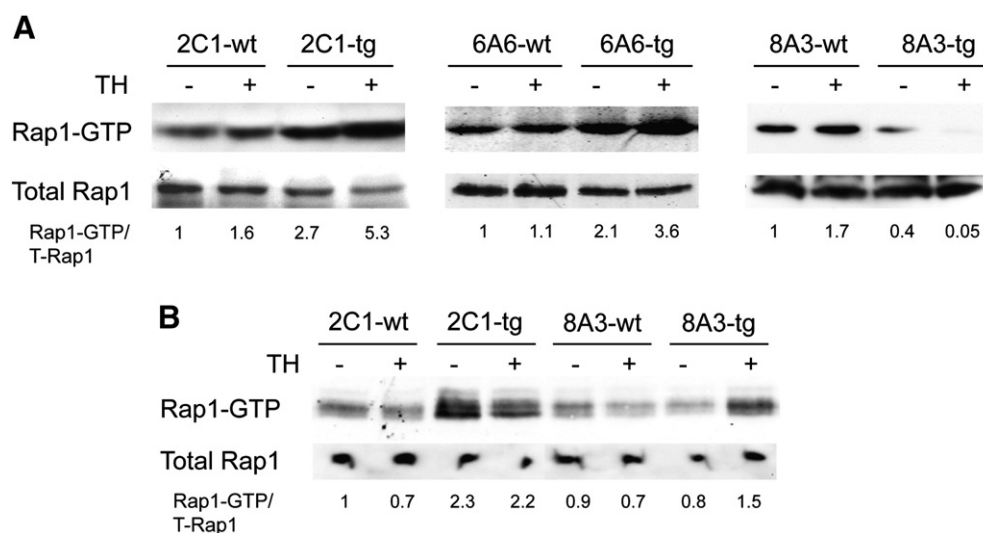


Fig. 5. Rap1 is differentially activated in C3G and C3G Δ Cat transgenic platelets. Platelets from tgC3G (2C1 and 6A6) or tgC3G Δ Cat (8A3) mice and their corresponding wild types were unstimulated (—) or stimulated (+) with 0.2 U/ml of α -thrombin for 1 min under (A) nonaggregating or (B) aggregating conditions. Platelets were then lysed, and activated Rap1 was isolated by binding to GST-RaIGDS-RBD and detected by immunoblotting with anti-Rap1 antibodies. The results shown are representative of three experiments with similar results. The ratio Rap1-GTP/Total Rap1 is indicated beneath the blots. wt: wild type, tg: transgenic, TH: thrombin.

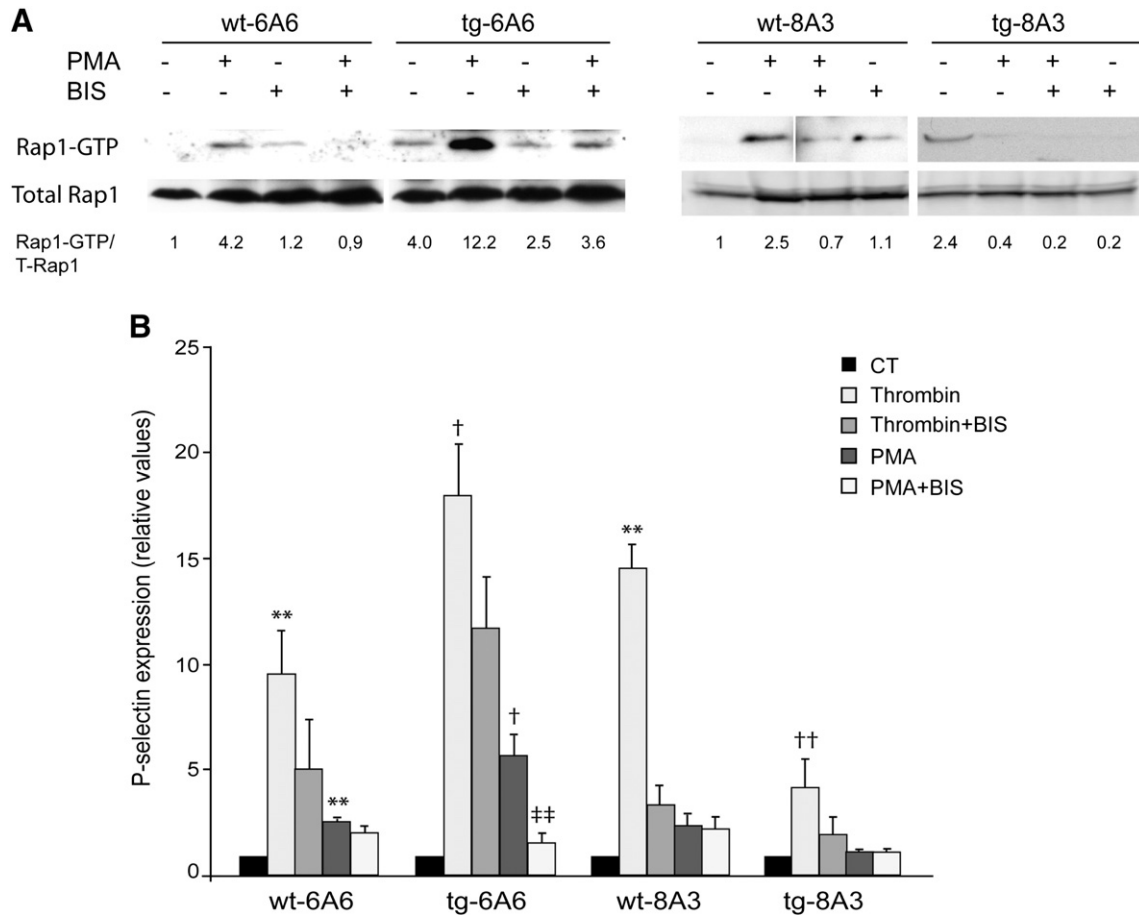


Fig. 6. C3G participates in PKC-mediated Rap1 activation. (A) Platelets from tgC3G (6A6) or tgC3GΔCat (8A3) mice and their corresponding wild types were unstimulated (–) or stimulated (+) with 0.2 μM PMA for 5 min in the presence or absence of 5 μM bisindolylmaleimide, which was added 5 min prior PMA stimulation. Platelets were then lysed, and activated Rap1 was isolated by binding to GST-RalGDS-RBD and detected by immunoblotting with anti-Rap1 antibodies. The ratio Rap1-GTP/Total Rap1 is indicated beneath the blots. wt: wild type, tg: transgenic. BIS: bisindolylmaleimide. (B) Washed blood from transgenic and wild type mice was stimulated with PMA (2 μM), α-thrombin (1 U/ml) and incubated with anti-CD62P-FITC antibody to determine the percentage of platelets expressing P-selectin on the surface. The histograms represent the mean ± SEM (n = 5). *p < 0.05, **p < 0.01 versus unstimulated CT; †p < 0.05, ††p < 0.01 versus the corresponding bar in WT; ‡‡p < 0.01 versus tg6A6-PMA. Control values were normalized to 1 for a better appreciation of the effect of the treatments within the different lines. wt: wild type, tg: transgenic. BIS: bisindolylmaleimide.

now identified C3G as the Rap1 GEF responsible for this Rap1 activation by PKC.

3.7. C3G transgenic mice showed an increase in neutrophils

As mentioned, we found no differences in the number of platelets between transgenic and control animals (Table 1). However, hemocytometric analysis showed a significant increase in neutrophils in tgC3G mice as compared with control siblings (Table 2). This result was verified by flow cytometry using granulocyte specific markers Ly-6G/6C (Gr1) and CD11b (Mac1) (Fig. 7A, B). In contrast, no significant effect was observed in C3GΔCat transgenic platelets. Moreover, no transgenic expression was detected in purified granulocytes obtained

from hydrocortisone-driven bone marrow differentiation (data not shown), in agreement with the specific expression of the PF4 promoter in megakaryocytes/platelets. Therefore, the increase in the percentage of neutrophils must be an indirect effect of the over-expression of C3G in platelets.

4. Discussion and conclusions

In this paper we demonstrate for the first time the involvement of C3G in platelet function. To do so, we have generated C3G transgenic mice in which the human C3G gene is under the megakaryocytic/platelet specific PF4 gene promoter. The backbone plasmid used in the generation of the transgenic constructs has been widely validated for its specific expression in megakaryocytes and platelets [24,25,31].

Platelets are non-nucleated cell fragments. This guarantees that our RNA preparations are free of genomic DNA contaminant. In addition, in the PCR analysis each pair of primers amplified several exons to ensure a cDNA origin of the template. The oligonucleotides used in the genotyping and expression characterization of the transgenic animals correspond to the human C3G sequence. In fact, we have detected endogenous C3G expression in human platelets with our sets of primers (data not shown). Thus, it is likely that most of the detected C3G would correspond to the human transgene. Nevertheless, considering the high homology between human and mouse sequences (87%), the mouse C3G endogenous gene is also detected in the wild type controls. Over-expression of the C3G transgenic

Table 2
C3G transgene increases the number of neutrophils in peripheral blood.

Age (months)	tgC3G	Wild type	p Value
4	25.35 ± 8.49	20.96 ± 5.18	0.033
6	27.06 ± 7.94	22.07 ± 5.06	0.024
8	29.59 ± 7.68	25.24 ± 5.94	0.033
10	31.00 ± 8.54	24.76 ± 6.27	0.064

Percentage of neutrophils (mean ± SEM) in C3G transgenic mice and wild type siblings. Measures were performed at different ages in 35 mice positive for C3G transgene, (2C1 and 6A6 lines) and 21 wild type mice, using a Hemavet Counter HV950FS. p Values for transgenic versus wild type neutrophil percentage are indicated.

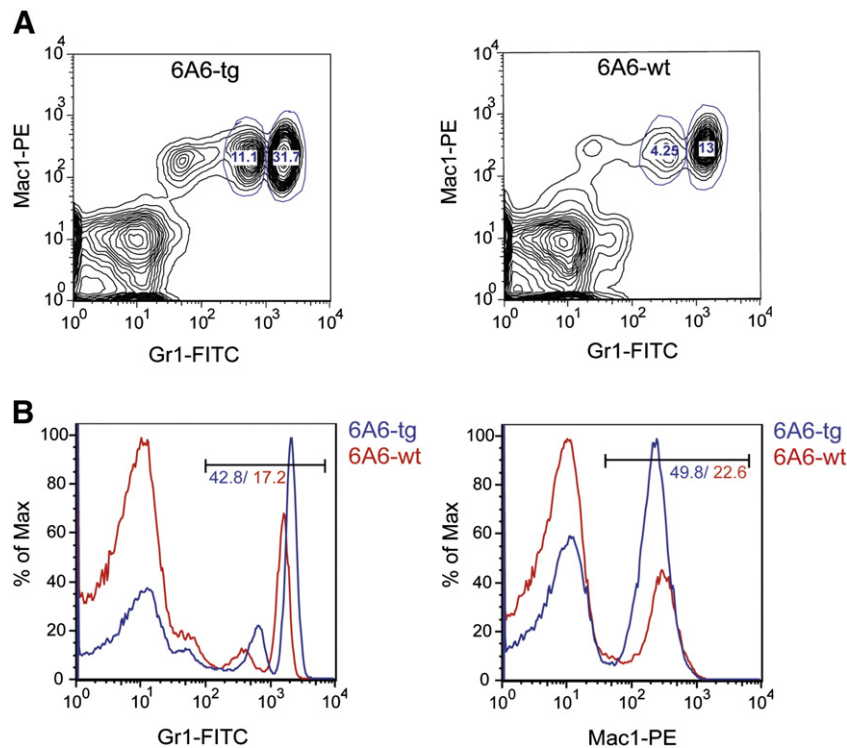


Fig. 7. C3G transgenic mice showed increased neutrophil counts. (A) Representative contour plots showing the percentage of double Gr1-FITC/Mac1-PE labeled cells in lysed blood of a 6A6 transgenic mouse and a wild type sibling. (B) Histograms represent the superimposed profiles of Gr1-FITC- (left panel) and Mac1-PE- (right panel) labeled cells in the 6A6-tg and 6A6-wt mice from the above plots. Numbers indicate the percentage of Gr1- and Mac1-expressing cells respectively. Graphs are representative of the analysis of more than 20 different mice from each genotype. Similar results were found with the 2C1 transgenic line. wt: wild type, tg: transgenic.

proteins is evident, both in megakaryocytes and platelets and their levels are sufficient to modify Rap1 activation and platelet function.

The results obtained with the full-length C3G transgene are strengthened by the use of two different chimeric lines. Furthermore, our results with this transgenic model are reinforced by the use of a dominant negative (DN) version of the transgene that blocks Rap1 activation and, consequently, platelet function. This DN function is clearly demonstrated by the decrease in Rap1-GTP levels observed in platelets from tgC3GΔCat (8A3) strain stimulated with thrombin (Fig. 5) and PMA (Fig. 6). This C3GΔCat mutant (which lacks the essential aminoacids for the GEF function) would act by sequestering upstream elements important for the activation of Rap1 by other GEFs. This hypothesis agrees with results from Fig. 4, showing a lower response to agonists in C3GΔCat platelets than that in wild type platelets. This C3G DN transgene (C3GΔCat) has been previously demonstrated to act as a negative mutant in other systems [29,32]. In all of our experimental approaches, the C3GΔCat mutant effect was opposite to that of the full C3G transgene. This clearly demonstrates that the effect of the C3G transgene is a direct effect on Rap1 and not a random or artifactual effect.

Results derived from blood clotting experiments demonstrate that C3G plays a relevant role in hemostasis. Hence, while control mice stop bleeding within the first 2 min, some of the C3GΔCat chimeras bled longer than 8 min, limit time of the experiment. In contrast, most C3G transgenic mice ceased bleeding within the first minute. These results are in agreement with the role of Rap1b in the regulation of the affinity state of integrin α IIb β 3 in mouse megakaryocytes and platelets [4,33]. Furthermore, our results indicate that C3G participates, at least, in thrombin, PMA, ADP and collagen-mediated platelet activation. In platelets, α -thrombin induces an early Rap1 activation, through a calcium-mediated pathway, independent of PKC activation. This is followed by a second activation phase mediated by PKC and, partially, by integrin α IIb β 3 [5,34].

So far, CalDAG-GEFI is the only Rap1 GEF with a proved role in platelet function [12–14,35]. CalDAG-GEFI knockout mice are severely deficient in platelet aggregation in response to low thrombin and partially impaired in response to low PMA concentration. However, CalDAG-GEFI knockout platelets are normally activated by high concentrations of these agonists (10 \times), and maintain a partial response to collagen, indicating the existence of CalDAG-GEFI-independent signaling pathways [12,14,36]. Here we show that, apart from CalDAG-GEFI, C3G is also endogenously expressed in platelets (see Fig. 2) and hence, it may play a physiological role. In fact, our results showing an increased response to thrombin in tgC3G platelets and an impaired response in tgC3GΔCat platelets, together with the opposite effects of both transgenes over thrombin-mediated Rap1 activation, indicate that C3G participates in a thrombin-Rap1 pathway in platelets.

Additionally, based on our results showing an increase in PMA-induced activation of tgC3G platelets, together with the fact that platelet aggregation triggered by PMA is not impaired in CalDAG-GEFI KO platelets [12], it can be proposed a specific involvement of C3G in the second (PKC-dependent) phase of Rap1 activation induced by thrombin [5,14]. This is further reinforced by results in Fig. 6 showing that PKC-mediated Rap1 activation is mainly dependent on C3G. Hence, based on the results presented here and on with previous results showing the existence of CalDAG-GEFI and PKC independent pathways for Rap1 activation [14], as well as participation of PKC in the second phase of thrombin-mediated Rap1 activation [5], it is possible to propose a model where C3G could be a mediator in the thrombin-stimulated pathways in platelets (Fig. 8). We can not exclude the possibility that the increase in Rap1-GTP induced by thrombin in tgC3G platelets is, in part, a reflect of the higher basal Rap1-GTP levels in these platelets. However, the levels of Rap1-GTP in PMA-stimulated tgC3G platelets are higher than the sum of basal Rap1-GTP in tgC3G platelets and Rap1-GTP induced by PMA in wild type platelets (Fig. 6A), which suggests an amplification of the thrombin

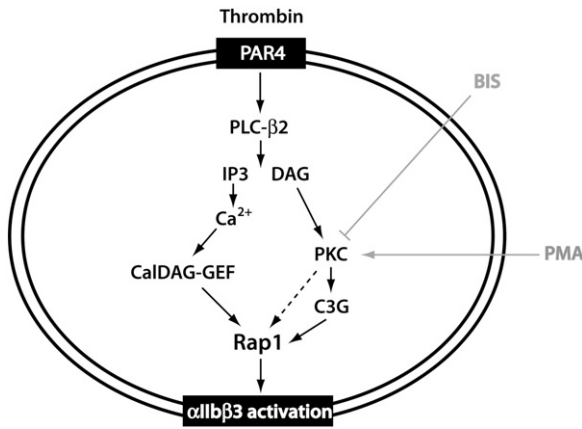


Fig. 8. Schematic representation of thrombin-triggered pathways leading to $\alpha\text{IIb}\beta 3$ activation in mouse platelets. C3G would participate in the PKC-mediated activation of Rap1. PLC- $\beta 2$: phospholipase C $\beta 2$; PAR4: protease activated receptor 4; BIS: bisindolylmaleimide, DAG: diacylglycerol; IP3: Inositol trisphosphate.

response and hence, the participation of C3G in this pathway. This is better reflected in Fig. 6B, where all controls have been normalized, and is also evident in the thrombin activation studies (Fig. 4A–B). In addition, other RapGEFs with detectable expression in mouse platelets [20] could contribute to PKC-dependent Rap1 activation, as there is still some platelet aggregation in transgenic C3G Δ Cat platelets stimulated with PMA.

ADP activates Rap1, both in human and mouse platelets [7–9,34]. So, our results showing an impaired response to ADP in tgC3G Δ Cat platelets indicate that C3G would mediate, at least in part, this ADP-induced Rap1 activation. We did not detect a significant ADP-induced activation of $\alpha\text{IIb}\beta 3$ integrin with JON/A antibody (data not shown). Nevertheless, ADP clearly activated fibrinogen-binding to $\alpha\text{IIb}\beta 3$ integrin, which is in agreement with a synergistic effect between fibrinogen and ADP [37]. The observed increase in integrin activation in tgC3G platelets stimulated with thrombin, ADP or collagen was not due to an upregulation of $\alpha\text{IIb}\beta 3$ gene expression induced by C3G, as we did not observe significant differences, either in total $\alpha\text{IIb}\beta 3$ content (Fig. 2D) or in that present on the surface (data not shown derived from cytometric analysis). Fibrinogen-binding and collagen-mediated aggregation assays indicate that C3G participates in the inside-out activation of $\alpha\text{IIb}\beta 3$ integrin. In addition, C3G contributes to collagen-mediated platelet activation probably through glycoprotein GPVI, the main collagen receptor that activates Rap1 in platelets [36,38,39].

It is well known that Rap1 protein levels increase during megakaryocyte maturation [40]. On the other hand, C3G silencing in the megakaryoblastic cell line MEG-01 results in a decrease in total Rap1 protein content (data not shown). This result is in agreement with the proposed role for C3G in the differentiation and maturation of megakaryocytes [3,41,42]. Despite this putative role of C3G, we found no differences in platelet number between transgenic and wild type animals, although this result is in agreement with the phenotype observed in Rap1b-null mice [4]. One potential explanation would be the participation of C3G in the initial steps of the megakaryopoiesis, but not in the final maturation to platelets.

Transgenic full-length C3G, but not C3G Δ Cat mice showed a significant increase in the number of neutrophils. As expected, purified neutrophils do not express transgenic C3G. This raises the possibility of an indirect effect of C3G overexpression in platelets, which could lead to the release of platelet-derived factors able to stimulate neutrophil development. It is known that platelets secrete chemokines that attract neutrophils and activate neutrophil production of pro-inflammatory cytokines [43]. For example, CXCL4 (PF4) can activate neutrophils in the presence of appropriate co-stimuli such as tumor

necrosis factor alpha (TNF- α). Therefore, it is reasonable to hypothesize that C3G could stimulate the production and release of one or several platelet factors that stimulate neutrophil production. In support of this hypothesis resting C3G transgenic platelets displayed a low, but significant activation, as compared to control platelets (see Fig. 4).

Results from our group and others support the involvement of C3G in chronic myeloid leukemia (CML) [44–46]. CML chronic phase is characterized by the presence of a high percentage of mature neutrophils in peripheral blood, which present high levels of CrkL phosphorylation, a constitutive C3G adaptor protein [47]. Moreover, platelet functions such as aggregation and clot retraction are often abnormal in chronic myelogenous leukemia (CML) patients [48,49]. CrkL is also abnormally phosphorylated in platelets from CML patients [50], similar to that observed in neutrophils. Interestingly, and in agreement with a putative role of C3G in neutrophils, Rap1a is activated by a variety of stimuli involved in neutrophil functions [51]. Rap1a interacts with neutrophil NADPH oxidase [52] and stimulates superoxide production during the oxidative burst [53]. Furthermore, another Rap1 GEF, CalDAG-GEF, has also been shown to play an important role in neutrophil function [13,35]. Based on that, our C3G transgenic models would be interesting tools in order to study, in a Bcr-Abl background, whether C3G plays a role in the initial steps of CML development by influencing abnormal neutrophil production and platelet function.

In conclusion, the work presented here shows for the first time that C3G plays a role in the regulation of platelet function and opens a new perspective on C3G as a potential therapeutic target in thrombotic disorders. Future studies will be conducted to determine whether C3G participates in inside-out or/and outside-in signaling and to dissect the specific signaling pathways that engage C3G in the regulation of Rap1 activity in platelets. Finally, the C3G transgenic mouse models will be useful to assess the potential role of C3G in neutrophil development and function as well as in CML development.

Funding

This work was supported by grants from the Ministry of Health (ISCIII) of Spain [FIS-PI070078 to CG and FIS-PI070071 to AP], by grants from the Ministry of Science and Innovation of Spain [SAF2010-20918-C02-02 to CG, SAF2010-20918-C02-01 to AP and BFU 2010-15237 to CG-M], by a grant from the Council of Education of Junta de Castilla y León, Spain [SA069A11-2 to CG] and by a grant for Research in Biomedicine from the Council of Health and Social Welfare of Junta de Castilla y León, Spain (to CG). VM was supported by a contract from ISCIII [FIS-PI070078]. SG-H. is a student supported by the University of Salamanca, Spain. MA is a pre-doctoral student supported by FPU fellowship from the Ministry of Education of Spain. All funding is cosponsored by the European FEDER Program. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions

CG was the principal investigator, designed the experiments and takes primary responsibility for the paper. SG-H, VM and JG-B performed most of the laboratory work for this study. NC and MS participated in the tail bleed assay and in the purification of platelets. SO-R participates in the Rap1 assays. CG-M, MP and JRG-P performed the aggregometry studies. MA contributed to the analysis of data. CG and AP co-ordinated the research and wrote the paper.

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.021>

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Katya Ravid (Boston University School of Medicine) for kindly providing PF4-Globin plasmid. We also thank Raquel Hernández (Department of Hematology, Hospital Universitario de Salamanca) for her assistance in the aggregometry studies, and to Isabel Ramos for assistance with the mice colony.

References

- [1] J.L. Bos, All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral, *EMBO J.* 17 (1998) 6776–6782.
- [2] S.J. Shattil, H. Kashiwagi, N. Pampori, Integrin signaling: the platelet paradigm, *Blood* 91 (1998) 2645–2657.
- [3] P.J. Stork, T.J. Dillon, Multiple roles of Rap1 in hematopoietic cells: complementary versus antagonistic functions, *Blood* 106 (2005) 2952–2961.
- [4] M. Chrzanowska-Wodnicka, S.S. Smyth, S.M. Schoenwaelder, T.H. Fischer, G.C. White, Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 680–687.
- [5] B. Franke, M. van Triest, K.M. de Bruijn, G. van Willigen, H.K. Nieuwenhuis, C. Negrier, J.W. Akkerman, J.L. Bos, Sequential regulation of the small GTPase Rap1 in human platelets, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 779–785.
- [6] Z. Wang, S.P. Holly, M.K. Larson, J. Liu, W. Yuan, M. Chrzanowska-Wodnicka, G.C. White, L.V. Parise, Rap1b is critical for glycoprotein VI-mediated but not ADP receptor-mediated α IIb β 1 activation, *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 693–700.
- [7] D. Woulfe, H. Jiang, R. Mortensen, J. Yang, L.F. Brass, Activation of Rap1B by G(i) family members in platelets, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 23382–23390.
- [8] P. Lova, S. Paganini, F. Sinigaglia, C. Balduini, M. Torti, A Gi-dependent pathway is required for activation of the small GTPase Rap1B in human platelets, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 12009–12015.
- [9] S.M. Jung, M. Ohnuma, N. Watanabe, M. Sonoda, M. Handa, M. Moroi, Analyzing the mechanism of Rap1 activation in platelets: Rap1 activation is related to the release reaction mediated through the collagen receptor GPVI, *Thromb. Res.* 118 (2006) 509–521.
- [10] J. Schultess, O. Danielewski, A.P. Smolenski, Rap1GAP2 is a new GTPase-activating protein of Rap1 expressed in human platelets, *Blood* 105 (2005) 3185–3192.
- [11] M.J. Lorenowicz, J. van Gils, M. de Boer, P.L. Hordijk, M. Fernandez-Borja, Epac1-Rap1 signaling regulates monocyte adhesion and chemotaxis, *J. Leukoc. Biol.* 80 (2006) 1542–1552.
- [12] J.R. Crittenden, W. Bergmeier, Y. Zhang, C.L. Piffath, Y. Liang, D.D. Wagner, D.E. Housman, A.M. Graybiel, CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation, *Nat. Med.* 10 (2004) 982–986.
- [13] W. Bergmeier, T. Goerge, H.W. Wang, J.R. Crittenden, A.C. Baldwin, S.M. Cifuni, D.E. Housman, A.M. Graybiel, D.D. Wagner, Mice lacking the signaling molecule CalDAG-GEFI represent a model for leukocyte adhesion deficiency type III, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 1699–1707.
- [14] S.M. Cifuni, D.D. Wagner, W. Bergmeier, CalDAG-GEFI and protein kinase C represent alternative pathways leading to activation of integrin α IIb β 3 in platelets, *Blood* 112 (2008) 1696–1703.
- [15] Y. Ohba, K. Ikuta, A. Ogura, J. Matsuda, N. Mochizuki, K. Nagashima, K. Kurokawa, B.J. Mayer, K. Maki, J. Miyazaki, M. Matsuda, Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis, *EMBO J.* 20 (2001) 3333–3341.
- [16] P.J. Stork, Does Rap1 deserve a bad Rap? *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 267–275.
- [17] N. Dube, M.R. Kooistra, W.J. Pannekoek, M.J. Vliem, V. Oorschot, J. Klumperman, H. Rehman, J.L. Bos, The RapGEF PDZ-GEF2 is required for maturation of cell–cell junctions, *Cell. Signal.* 20 (2008) 1608–1615.
- [18] A. Arai, Y. Nosaka, H. Kohsaka, N. Miyasaka, O. Miura, Crkl activates integrin-mediated hematopoietic cell adhesion through the guanine nucleotide exchange factor C3G, *Blood* 93 (1999) 3713–3722.
- [19] R. de Jong, A. van Wijk, N. Heisterkamp, J. Groffen, C3G is tyrosine-phosphorylated after integrin-mediated cell adhesion in normal but not in Bcr/Abl expressing cells, *Oncogene* 17 (1998) 2805–2810.
- [20] J.W. Rowley, A.J. Oler, N.D. Tolley, B.N. Hunter, E.N. Low, D.A. Nix, C.C. Yost, G.A. Zimmerman, A.S. Weyrich, Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes, *Blood* 118 (2011) e101–e111.
- [21] M. Sattler, R. Salgia, Role of the adapter protein CRKL in signal transduction of normal hematopoietic and BCR/ABL-transformed cells, *Leukemia* 12 (1998) 637–644.
- [22] K. Eto, R. Murphy, S.W. Kerrigan, A. Bertoni, H. Stuhlmann, T. Nakano, A.D. Leavitt, S.J. Shattil, Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 12819–12824.
- [23] C. Guerrero, A. Fernandez-Medarde, J.M. Rojas, J. Font de Mora, L.M. Esteban, E. Santos, Transformation suppressor activity of C3G is independent of its CDC25-homology domain, *Oncogene* 16 (1998) 613–624.
- [24] K. Ravid, D.L. Beeler, M.S. Rabin, H.E. Ruley, R.D. Rosenberg, Selective targeting of gene products with the megakaryocyte platelet factor 4 promoter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 1521–1525.
- [25] Y. Zhang, Y. Nagata, G. Yu, H.G. Nguyen, M.R. Jones, P. Toselli, C.W. Jackson, M. Tatsuka, K. Todokoro, K. Ravid, Aberrant quantity and localization of Aurora-B/AIM-1 and survivin during megakaryocyte polyploidization and the consequences of Aurora-B/AIM-1-deregulated expression, *Blood* 103 (2004) 3717–3726.
- [26] S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 1215.
- [27] W. Bergmeier, V. Schulte, G. Brockhoff, U. Bier, H. Zirngibl, B. Nieswandt, Flow cytometric detection of activated mouse integrin α IIb β 3 with a novel monoclonal antibody, *Cytometry* 48 (2002) 80–86.
- [28] B. Nieswandt, M. Moser, I. Pleines, D. Varga-Szabo, S. Monkley, D. Critchley, R. Fassler, Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation *in vitro* and *in vivo*, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 3113–3118.
- [29] C. Guerrero, S. Martin-Encabo, A. Fernandez-Medarde, E. Santos, C3G-mediated suppression of oncogene-induced focus formation in fibroblasts involves inhibition of ERK activation, cyclin A expression and alterations of anchorage-independent growth, *Oncogene* 23 (2004) 4885–4893.
- [30] P. Lova, S. Paganini, E. Hirsch, L. Barberis, M. Wymann, F. Sinigaglia, C. Balduini, M. Torti, A selective role for phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in the Gi-dependent activation of platelet Rap1B, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 131–138.
- [31] N. Papadantonakis, M. Makitalo, D.J. McCrann, K. Liu, H.G. Nguyen, G. Martin, S. Patel-Hett, J.E. Italiano, K. Ravid, Direct visualization of the endomitotic cell cycle in living megakaryocytes: differential patterns in low and high ploidy cells, *Cell Cycle (Georgetown Tex)* 7 (2008) 2352–2356.
- [32] S. Martin-Encabo, E. Santos, C. Guerrero, C3G mediated suppression of malignant transformation involves activation of PP2A phosphatases at the subcortical actin cytoskeleton, *Exp. Cell Res.* 313 (2007) 3881–3891.
- [33] A. Bertoni, S. Tadokoro, K. Eto, N. Pampori, L.V. Parise, G.C. White, S.J. Shattil, Relationships between Rap1b, affinity modulation of integrin α IIb β 3, and the actin cytoskeleton, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25715–25721.
- [34] B. Franke, J.W. Akkerman, J.L. Bos, Rapid Ca^{2+} -mediated activation of Rap1 in human platelets, *EMBO J.* 16 (1997) 252–259.
- [35] R. Pasvolsky, S.W. Feigelson, S.S. Kilic, A.J. Simon, G. Tal-Lapidot, V. Grabovsky, J.R. Crittenden, N. Amariglio, M. Safran, A.M. Graybiel, G. Rechavi, S. Ben-Dor, A. Etzioni, R. Alon, A LAD-III syndrome is associated with defective expression of the Rap-1 activator CalDAG-GEFI in lymphocytes, neutrophils, and platelets, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 1571–1582.
- [36] B. Nieswandt, D. Varga-Szabo, M. Elvers, Integrins in platelet activation, *J. Thromb. Haemost.* 7 (Suppl. 1) (2009) 206–209.
- [37] C. Gachet, A. Stierlé, P. Ohlmann, F. Lanza, D. Hanau, J.P. Cazenave, Normal ADP-induced aggregation and absence of dissociation of the membrane GP IIb/IIIa complex of intact rat platelets pretreated with EDTA, *Thromb. Haemost.* 66 (1991) 246–253.
- [38] M.K. Larson, H. Chen, M.L. Kahn, A.M. Taylor, J.E. Fabre, R.M. Mortensen, P.B. Conley, L.V. Parise, Identification of P2Y12-dependent and -independent mechanisms of glycoprotein VI-mediated Rap1 activation in platelets, *Blood* 101 (2003) 1409–1415.
- [39] B. Nieswandt, C. Brakebusch, W. Bergmeier, V. Schulte, D. Bouvard, R. Mokhtari-Nejad, T. Lindhout, J.W. Heemskerk, H. Zirngibl, R. Fassler, Glycoprotein VI but not α IIb β 1 integrin is essential for platelet interaction with collagen, *EMBO J.* 20 (2001) 2120–2130.
- [40] A. Balduini, A. Pecci, P. Lova, N. Arezzi, C. Marseglia, F. Bellora, C. Perotti, C. Balduini, C. Balduini, M. Torti, Expression, activation, and subcellular localization of the Rap1 GTPase in cord blood-derived human megakaryocytes, *Exp. Cell Res.* 300 (2004) 84–93.
- [41] H. Morita, T. Tahara, A. Matsumoto, T. Kato, H. Miyazaki, H. Ohashi, Functional analysis of the cytoplasmic domain of the human Mpl receptor for tyrosine-phosphorylation of the signaling molecules, proliferation and differentiation, *FEBS Lett.* 395 (1996) 228–234.
- [42] F.K. Racke, K. Lewandowska, S. Goueli, A.N. Goldfarb, Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 23366–23370.
- [43] A. Zarbock, R.K. Polanowska-Grabowska, K. Ley, Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation, *Blood Rev.* 21 (2007) 99–111.
- [44] Y.J. Cho, B. Hemmeryckx, J. Groffen, N. Heisterkamp, Interaction of Bcr/Abl with C3G, an exchange factor for the small GTPase Rap1, through the adapter protein Crkl, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333 (2005) 1276–1283.
- [45] J. Gutierrez-Berzal, E. Castellano, S. Martin-Encabo, N. Gutierrez-Cianca, J.M. Hernandez, E. Santos, C. Guerrero, Characterization of p87C3G, a novel, truncated C3G isoform that is overexpressed in chronic myeloid leukemia and interacts with Bcr-Abl, *Exp. Cell Res.* 312 (2006) 938–948.
- [46] V. Maia, M. Sanz, J. Gutierrez-Berzal, A. de Luis, A. Gutierrez-Uzquiza, A. Porras, C. Guerrero, C3G silencing enhances STI-571-induced apoptosis in CML cells through p38 MAPK activation, but it antagonizes STI-571 inhibitory effect on survival, *Cell. Signal.* 21 (2009) 1229–1235.
- [47] T. Oda, C. Heaney, J.R. Hagopian, K. Okuda, J.D. Griffin, B.J. Drucker, Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 22925–22928.
- [48] Y. Sultan, J.P. Caen, Platelet dysfunction in preleukemic states and in various types of leukemia, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 201 (1972) 300–306.
- [49] H. Gralnick, Hemostasis and thrombosis in acute and chronic leukemia, in: E.S. Henderson, T.A. Lister (Eds.), *Leukemia*, ed 5, Saunders, Philadelphia, PA, 1990, p. 711.
- [50] A. Oda, Y. Miyakawa, B.J. Drucker, A. Ishida, K. Ozaki, H. Ohashi, M. Wakui, M. Handa, K. Watanabe, S. Okamoto, Y. Ikeda, Crkl is constitutively tyrosine phosphorylated in platelets from chronic myelogenous leukemia patients and inducibly phosphorylated in normal platelets stimulated by thrombopoietin, *Blood* 88 (1996) 4304–4313.

- [51] L. M'Rabet, P. Coffey, F. Zwartkruis, B. Franke, A.W. Segal, L. Koenderman, J.L. Bos, Activation of the small GTPase rap1 in human neutrophils, *Blood* 92 (1998) 2133–2140.
- [52] M.T. Quinn, C.A. Parkos, L. Walker, S.H. Orkin, M.C. Dinauer, A.J. Jesaitis, Association of a Ras-related protein with cytochrome b of human neutrophils, *Nature* 342 (1989) 198–200.
- [53] Y. Li, J. Yan, P. De, H.C. Chang, A. Yamauchi, K.W. Christopherson II, N.C. Paranavitana, X. Peng, C. Kim, V. Munugalavadla, R. Kapur, H. Chen, W. Shou, J.C. Stone, M.H. Kaplan, M.C. Dinauer, D.L. Durden, L.A. Quilliam, Rap1a null mice have altered myeloid cell functions suggesting distinct roles for the closely related Rap1a and 1b proteins, *J. Immunol.* 179 (2007) 8322–8331.